

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PHYSIOLOGIE
PROF. DR. MED. ARMIN KURTZ
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Mechanismen der renalen kompensatorischen Hypertrophie:
Untersuchung des Einflusses der autokrinen Produktion natriuretischer Peptide auf die
Hypertrophie anhand eines in vitro-Flussmodells**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Verena Lehnerer

2015

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PHYSIOLOGIE
PROF. DR. MED. ARMIN KURTZ
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Mechanismen der renalen kompensatorischen Hypertrophie:
Untersuchung des Einflusses der autokrinen Produktion natriuretischer Peptide auf die
Hypertrophie anhand eines in vitro-Flussmodells**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Verena Lehnerer

2015

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Frank Schweda
2. Berichterstatter:	PD Dr. Miriam Banas
Tag der mündlichen Prüfung:	14. Januar 2016

I. Einleitung	7
1. Aufbau und Funktion der Niere	7
1.1 Glomeruläre Filtration	8
1.2 Charakteristika des proximalen Tubulus	10
2. Kompensatorische renale Hypertrophie	12
2.1 Ursachen und Charakteristika der kompensatorischen Hypertrophie	12
2.2 Fortschritte im Verständnis der kompensatorischen Hypertrophie	15
2.3 „Workload“-Hypothese der kompensatorischen Hypertrophie	18
3. Die Familie der natriuretischen Peptide	20
3.1 Vorversuche zur Bedeutung der NPs im Rahmen der kompensatorischen renalen Hypertrophie	20
3.2 Systematik und Struktur der natriuretischen Peptide	21
3.3 Synthese und Mechanismen der Elimination natriuretischer Peptide	22
3.4 Rezeptoren der natriuretischen Peptide, Signaltransduktion sowie Regulation der GC-A-Aktivität	26
3.5 Physiologische Wirkungen der natriuretischen Peptide	29
4. Fragestellung der Arbeit	32
II. Methoden	35
1. Zellbiologische Methoden (Zellkultur)	35
1.1 Kultivierung und Passagieren von LLC-PK ₁ -Zellen	35
1.2 Einfrieren und Auftauen von LLC-PK ₁ -Zellen	36
1.3 Isolation und Kultivierung von proximalen Tubuluszellen aus der Maus	37
1.4 Zählen und Aussäen von proximalen Tubuluszellen	42
2. Stimulation von proximalen Tubuluszellen	43
3. Superfusion von proximalen Tubuluszellen	44
3.1 In vitro-Flussmodell - Versuchsaufbau und Funktionsprinzip	44
3.2 Versuchsdurchführung und -bedingungen	47

4.	DNA- und Protein-Bestimmung aus proximalen Tubuluszellen	48
5.	Molekularbiologische Methoden	50
5.1	RNA-Isolation aus primären proximalen Tubuluszellen	50
5.1.1	Isolation der Gesamt-RNA	50
5.1.2	Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	51
5.2	Reverse Transkription der isolierten RNA (cDNA-Synthese)	51
5.3	Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (RTqPCR)	52
5.3.1	Prinzip der RTqPCR	52
5.3.2	Durchführung und Auswertung der RTqPCR	53
5.4	DNA-Agarosegelelektrophorese	55
5.4.1	Elektrophorese und Detektion der DNA	55
5.4.2	Interpretation der Gelfotos	56
6.	Immunologische Methode: Enzym-Immunoassay (EIA) zur Konzentrationsbestimmung der natriuretischen Peptide ANP und BNP im Perfusat	58
7.	Statistische Auswertung	58
III.	Ergebnisse	60
1.	Direkte konzentrationsabhängige Wirkung natriuretischer Peptide auf primäre proximale Tubuluszellen	60
1.1	Konzentrationsabhängige Hypertrophie infolge ANP-Stimulation	60
1.2	Konzentrationsabhängige Hypertrophie infolge BNP-Stimulation	64
2.	Charakterisierung des verwendeten Zellmodells	67
2.1	Hypertrophie von primären proximalen Tubuluszellen infolge Superfusion	68
2.2	Hypertrophie von LLC-PK ₁ -Zellen infolge Superfusion	70
2.3	Perfusionsabhängige Genexpression in primären proximalen Tubuluzellen	72
2.3.1	Perfusionsabhängige Genexpression der Housekeeping-Gene RP L32 und Aktin	73
2.3.2	Perfusionsabhängige Genexpression der Cyclin-abhängigen Kinasen CDK2 und 4 ..	74
2.3.3	Perfusionsabhängige Genexpression der natriuretischen Peptidrezeptoren NPR-A und -C	77
2.3.4	Perfusionsabhängige Genexpression der neutralen Endopeptidase 24.11 (NEP)	80

2.3.5	Perfusionsabhängige Genexpression der renalen Transporter SGLT1 und NHE ₃ sowie des AT _{1A} -Rezeptors	83
3.	In vitro-Untersuchungen zum Einfluss einer lokalen ANP-/Urodilatinproduktion bei der flussinduzierten Hypertrophie primärer proximaler Tubuluszellen	85
3.1	Vergleich der Basalwerte von Wildtyp-Zellen und ANP-Knockout-Zellen	86
3.2	Hypertrophie von ANP-Knockout-Zellen infolge Superfusion im Vergleich zu Wildtyp-Zellen	88
3.3	Hypertrophie von ANP-Knockout-Zellen infolge TGFβ-Stimulation im Vergleich zu Wildtyp-Zellen	90
3.4	Hypertrophie von ANP-Knockout-Zellen infolge ANP-Stimulation im Vergleich zu Wildtyp-Zellen	93
4.	Nachweis von ANP und BNP bei der flussinduzierten Hypertrophie primärer proximaler Tubuluszellen	97
4.1	ANP- bzw. BNP-Messung im Perfusat	97
4.2	Perfusionsabhängige Genexpression der natriuretischen Peptide ANP und BNP	97
IV.	Diskussion	101
1.	Die natriuretischen Peptide ANP und BNP lösen eine Hypertrophie primärer proximaler Tubuluszellen der Maus aus	102
2.	Gültigkeit der „workload“-Hypothese im verwendeten in vitro-Zellmodell	106
3.	Charakterisierung des verwendeten in vitro-Zellmodells	107
3.1	Housekeeping-Gene	108
3.2	Zellzyklus und Hypertrophie	109
3.3	Regulation der NP-Rezeptoren sowie der NEP 24.11	112
3.4	Bedeutung verschiedener Transportproteine des proximalen Tubulus sowie des AT _{1A} -Rezeptors	115
4.	Lokale Produktion natriuretischer Peptide im proximalen Tubulus als Vermittler der kompensatorischen Hypertrophie im in vitro-Zellmodell	118
4.1	Bedeutung von ANP bzw. Urodilatin	118
4.2	Bedeutung von BNP - Möglichkeit des Ausgleichs bei ANP-/Urodilatin-Defizit ...	121
V.	Zusammenfassung	124
VI.	Literaturverzeichnis	126

VII. Abbildungsverzeichnis	145
VIII. Abkürzungsverzeichnis	150
IX. Materialien und Methoden	156
1. LLC-PK ₁ -Zelllinie sowie Mäuse für die Primärkultur	156
2. Geräte und Verbrauchsmaterialien	156
3. Zellkulturmedien, Medienzusätze sowie weitere Puffer und Lösungen	160
4. Chemikalien und Reagenzien	163
5. Enzyme und Kit-Systeme	165
6. Oligonukleotide (Primer)	166
7. Software und Internetadressen	168
8. Standardmethoden	168
8.1 Prinzip der Standard-PCR	168
8.2 Herstellung des Agarosegels	169

Danksagung

Eidesstattliche Erklärung

I. Einleitung

1. Aufbau und Funktion der Niere

Die in Säugern paarig angelegten Nieren liegen als Teil des Harnwegsystems in der sog. Fettkapsel des Retroperitonealraums. Dabei gliedern sich die gleichartigen, miteinander verschmolzenen Einheiten der Niere, die Lobi renales, makroskopisch in drei Bereiche: den oberflächennahen Rindenbereich (Cortex renalis) sowie das äußere und innere Nierenmark (Medulla renalis). Über die Papille, die Spitze des kegelförmigen Nierenmarks, kann der produzierte Endharn in die Nierenkelche, das Nierenbecken und schließlich in den Ureter abfließen und ausgeschieden werden (Abb. 1.1).

Bei mikroskopischer Betrachtung stellt sich als funktionelle Einheit des Nierenparenchyms das Nephron dar, wobei die menschliche Niere 1-1,5 Mio. davon besitzt. Jedes Nephron besteht aus einem kortikalen Nierenkörperchen und den sich daran anschließenden Segmenten des unverzweigten Tubulussystems. Das Nierenkanälchen ist in den proximalen Tubulus, den Intermediärtubulus und den distalen Tubulus unterteilt, wobei die Pars recta des proximalen Tubulus, der Intermediärtubulus sowie die Pars recta des distalen Tubulus als Henle-Schleife bezeichnet werden. Mehrere distale Tubuli münden über je einen Verbindungstubulus in ein Sammelrohr, das von der Rinde bis ins Mark zieht, wo es nach Fusion mit weiteren Sammelrohren als Ductus papillaris auf der Papille mündet. Abb. 1.1 veranschaulicht das strenge Muster der topographischen Verteilung aller Tubulusabschnitte im Nierenparenchym.

Folgende drei Grundmechanismen der Harnbildung sind in jeder Funktionseinheit realisiert: die Filtration des Blutplasmas in den Glomeruli, die Rückresorption und Sekretion verschiedener Substanzen mit folgender Harnkonzentrierung entlang des Nierenkanälchens.

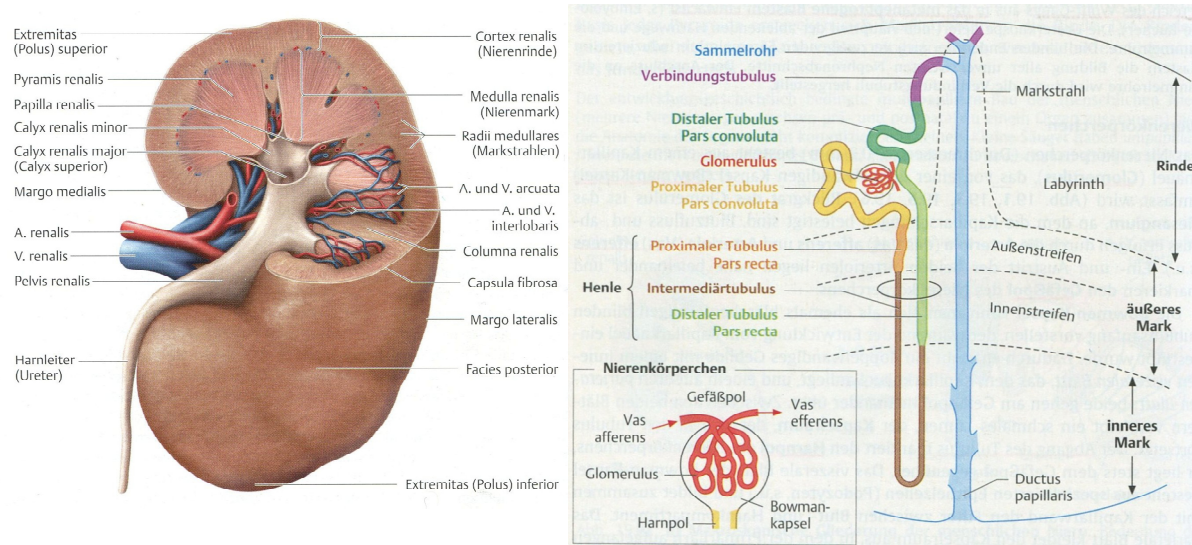


Abb. 1.1: Anatomischer Aufbau der Niere (links) (aus [34])
Schematische Darstellung der Nephronabschnitte (rechts) (aus [37])

Die Aufgaben der Niere sind vielfältig. Neben der lebensnotwendigen Exkretion wasserlöslicher Stoffwechselendprodukte (harnpflichtige Substanzen) und anderer Toxine (z.B. Medikamente) spielt sie eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase des Säure-Basen-Haushalts sowie des Wasser- und Elektrolythaushalts. Aus der Regulation des Blutvolumens resultiert auch der entscheidende Einfluss der Niere auf die langfristige Blutdruckeinstellung. Des Weiteren bildet sie als endokrines Organ unter anderem Erythropoetin, Calcitriol und Renin. Zugleich entfalten einige Hormone umgekehrt ihre Wirkung an der Niere, wie beispielsweise Aldosteron, ADH, die Katecholamine oder die natriuretischen Peptide. [34-37]

Da bei meinen Untersuchungen zur kompensatorischen renalen Hypertrophie die glomeruläre Filtration und der proximale Tubulus im Zentrum der Betrachtung stehen, soll im Folgenden näher darauf eingegangen werden.

1.1 Glomeruläre Filtration

Im Glomerulus (Abb. 1.2 a), den anastomosierenden Kapillarschlingen zwischen afferenter und efferenter Arteriole, die von der Bowman-Kapsel umschlossen werden, wird ca. 20 % des

renalen Plasmaflusses als Primärharn abfiltriert. Der dreilagige Glomerulusfilter („Blut-Harn-Schranke“ Abb. 1.2 b/c), bestehend aus dem gefensterten Kapillarendothel, der Basalmembran und den Podozytenfußfortsätzen, stellt hierbei eine größen- und ladungsabhängige Barriere dar, wobei insbesondere Proteine und Plasmabestandteile mit einer Größe von ca. 10 bis 70 kDa in Abhängigkeit ihrer negativen Ladung zurückgehalten werden, während größere Moleküle allein aufgrund ihres Molekulargewichts den Filter nicht passieren können. Das entstehende Ultrafiltrat entspricht somit bezüglich seiner Zusammensetzung dem Blutplasma unter Ausschluss großer Plasmaproteine und der korpuskulären Bestandteile. Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR), d.h. die Menge des pro Zeiteinheit von beiden Nieren produzierten Primärharns (ca. 125 ml/min = 180 l/d), ergibt sich als Produkt aus dem Filtrationskoeffizienten K_F (Fläche und Wasserdurchlässigkeit des Filters) der Nieren und dem effektiven Filtrationsdruck (p_{eff}). Die treibende Kraft der Filtration p_{eff} berechnet sich wiederum aus dem hydrostatischen Kapillardruck abzüglich des hydrostatischen Drucks in der Bowman-Kapsel und des kolloidosmotischen Drucks im Plasma. Zu Beginn des Gefäßknäuels beträgt p_{eff} ca. 10 mmHg; im Verlauf der Glomeruluskapillaren steigt der onkotische Kapillardruck jedoch langsam an, sodass p_{eff} im letzten Drittel auf 0 mmHg absinkt. Es stellt sich also ein Filtrationsgleichgewicht ein, bei dem die Filtration in Richtung der efferenten Arteriole zum Erliegen kommt. Die Regulation der GFR kann sowohl über eine Änderung des glomerulären Perfusionsdruckes, vorwiegend über die Einstellung des Strömungswiderstands in der afferenten und efferenten Arteriole mittels Konstriktion und Dilatation, als auch über eine Änderung des Filtrationskoeffizienten erfolgen. [34-37] So können beispielsweise die Podozyten aufgrund ihres gut entwickelten kontraktile Apparates K_F aktiv modulieren, wobei ihre Relaxation mit einer Steigerung der GFR einhergeht. [41-44] Zur Aufrechterhaltung einer konstanten Filtrationsleistung trotz Blutdruckschwankungen dienen darüber hinaus verschiedene intrarenale Mechanismen, namentlich die myogene Autoregulation sowie das tubuloglomeruläre Feedback. Ein nicht zu unterschätzender Einfluss auf die GFR geht auch vom autonomen Nervensystem sowie sämtlichen Hormonen des RAAS ebenso wie von seinem funktionellen Antagonisten ANP aus. [34-37]

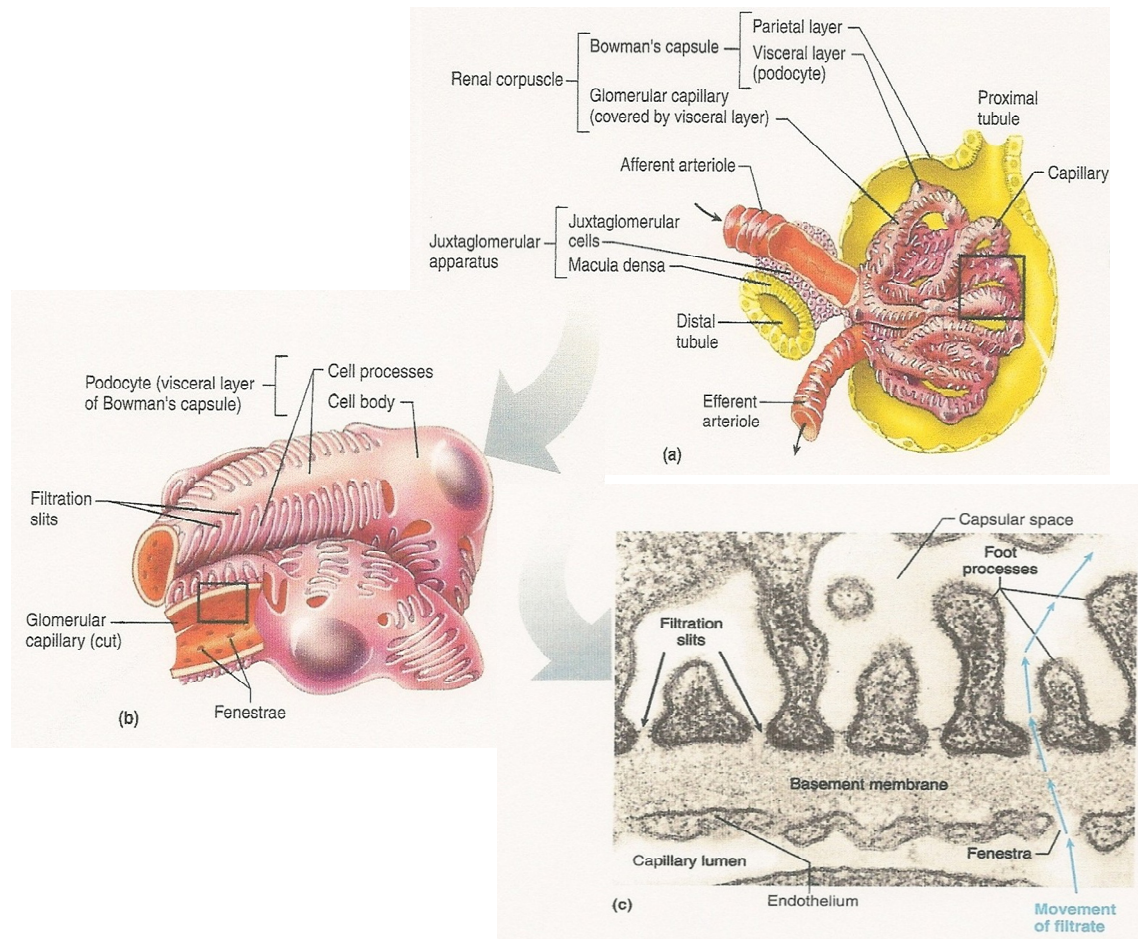


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Glomerulus (a+b), EM-Aufnahme der „Blut-Harn-Schranke“ (c) (aus [35])

1.2 Charakteristika des proximalen Tubulus

Die Bowman-Kapsel verjüngt sich zum proximalen Tubulus, dessen Anfangsteil, die Pars convoluta, neben den Glomeruli den überwiegenden Anteil des Kortex ausmacht. Bei mikroskopischer Betrachtung auffallende strukturelle Charakteristika sind als direkte Korrelate der funktionellen Besonderheiten des proximalen Konvoluts im Sinne eines transportierenden Epithels anzusehen. Zur Oberflächenvergrößerung befinden sich auf der apikalen Membran zahlreiche Mikrovilli. Dieser dichte Bürstensaum ist von einer Glykokalix bedeckt und enthält verschiedene Enzyme, wie z.B. die alkalische Phosphatase oder die γ -Glutamyltranspeptidase, die auch als spezifische Markerenzyme eingesetzt werden können. [46] Auf der basalen Seite der Tubuluszellen findet man neben ausgeprägten basolateralen Einfaltungen eine Vielzahl an Mitochondrien, welche die Na^+/K^+ -ATPase, die treibende Kraft für fast alle Resorptionsvorgänge, mit ATP versorgen. Das sog. lecke Epithel des proximalen

Tubulus bedingt sowohl die enge Koppelung der Wasser- und Salzresorption als auch den isoosmotischen Massentransport. So werden bereits in diesem Nephronabschnitt 65 % des filtrierten Wassers und Na^+ rückresorbiert. Zahlreiche Lysosomen und Vesikel dienen des Weiteren dem Abbau von durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommenen kleinen Proteinen. Als polyspezifischer Rezeptor dient hierbei ein Komplex aus Cubilin und Megalin. [47, 51]

Insgesamt spielen sich im proximalen Tubulus eine Vielzahl von Resorptions- und Sekretionsvorgängen ab, die sich wie beschrieben morphologisch niederschlagen. Dabei ist die Substratresorption häufig an den Transport von Na^+ entlang des elektrochemischen Gradienten gekoppelt, der von der in der basolateralen Membran lokalisierten Na^+/K^+ -ATPase unter ATP-Verbrauch aufrechterhalten wird. Im Folgenden sollen stellvertretend zwei in Verbindung mit der kompensatorischen renalen Hypertrophie häufig erwähnte Transportmechanismen dargestellt werden.

Für die praktisch vollständige Resorption des glomerulär filtrierten Monosaccharids Glucose existieren in der luminalen Membran zwei Na^+ -gekoppelte und damit sekundär aktive Cotransportsysteme. Im Anfangsbereich des proximalen Tubulus (S1-Segment) dominiert der SGLT2, der Na^+ und Glucose im Verhältnis 1:1 transportiert. Dieser Carrier verfügt über eine hohe Kapazität bei zugleich niedriger Affinität. Vor allem spätproximal (S3-Segment der Pars recta) wird der SGLT1 exprimiert, ein hochaffiner Monosaccharidtransporter mit relativ geringer Kapazität, welcher für ein Glucosemolekül die Triebkraft von zwei Na^+ nutzt. Die luminal aufgenommene Glucose gelangt durch erleichterte Diffusion mit Hilfe des spezifischen, natriumunabhängigen Uniporters GLUT2 ins Interstitium. [34-37]

Der im Rahmen des Säure-Basen-Haushalts entscheidende sekundär aktive Antiportcarrier NHE_3 , der für jedes resorbierte Na^+ ein H^+ -Ion ins Tubulolumen sezerniert, trägt mit dazu bei, dass im proximalen Tubulus 95 % des filtrierten Bikarbonats rückresorbiert werden können. Die ausgeschleusten Protonen bilden nämlich mit dem Bikarbonat des Primärharns Kohlensäure, die durch die Carboanhydrase IV der Bürstensaummembran rasch in CO_2 und H_2O zerlegt wird. CO_2 diffundiert in die Tubuluszelle zurück, wird erneut zu Kohlensäure hydratisiert und dissoziiert spontan in H^+ und Bikarbonat. H^+ steht nun dem NHE_3 wieder zur Verfügung, während Bikarbonat basolateral zusammen mit Na^+ ausgeschleust wird ($1\text{Na}^+ - 3\text{HCO}_3^-$ -Cotransport, NBC-1-Carrier). [34-37]

2. Kompensatorische renale Hypertrophie

Im Hinblick darauf, dass die vorliegende Arbeit einen Beitrag zur weiteren Aufklärung der Mechanismen der kompensatorischen renalen Hypertrophie leisten soll, werden zunächst einige Kennzeichen des beobachteten Phänomens an sich sowie grundlegende bisherige Erkenntnisse und aufgestellte Hypothesen im Überblick dargestellt.

2.1 Ursachen und Charakteristika der kompensatorischen Hypertrophie

Im Allgemeinen verändert sich die Nierengröße bzw. -masse eines Organismus nach Abschluss seines Körperwachstums nicht mehr wesentlich. [49] Im Falle des Verlusts von funktionsfähigem Nierengewebe resultiert allerdings im Rahmen der Anpassungsreaktion ein kompensatorisches Wachstum des noch vorhandenen, intakten Nierengewebes. Dies gilt sowohl für den Ausfall einer ganzen Niere, beispielsweise in Form einer chirurgischen Intervention, als auch für den partiellen Funktionsverlust innerhalb einer Niere als Folge einer angeborenen oder erworbenen renalen Erkrankung. [1, 50, 60] Neben einer makroskopisch beobachtbaren Größen- bzw. Gewichtszunahme der funktionstüchtigen Niere kommt es zugleich zu einer Steigerung ihrer funktionellen Kapazität, sodass Säuger mit nur einer Niere zunächst nicht an renaler Insuffizienz leiden. [48, 50] Das beschriebene Phänomen an sich ist dabei schon sehr lange bekannt. [49] So erkannte bereits Aristoteles (384-322 v. Chr., *De animalium generatione*), dass bei kongenitalem Fehlen einer Niere das Überleben sowie eine normale Entwicklung möglich ist. In zahlreichen Untersuchungen des letzten Jahrhunderts konnte man das Prinzip der kompensatorischen renalen Hypertrophie für diverse Spezies nachweisen [62], wobei das bei diesen Untersuchungen am häufigsten verwendete in vivo-Modell die unilaterale Nephrektomie darstellt. [4, 59, 61, 63, 64] So wurde das kompensatorische Nierenwachstum beim Menschen [59, 74] genauso wie bei Ratten [58, 105], Mäusen [72, 115], Kaninchen [79] und Hunden [84] belegt; eine Ausnahme bildeten allerdings Katzen [70] und Paviane [71]. Des Weiteren existieren für eine Größenzunahme der Niere neben der Uninephrektomie eine Reihe weiterer auslösender Faktoren. [23, 49, 81, 91] Dies betrifft zum einen sämtliche Nierenerkrankungen, wie die einseitige Hydronephrose infolge einer Ureterobstruktion [75, 80, 82-85, 107], die einseitige Nierenarterienstenose [76], den insulinabhängigen Diabetes mellitus bzw. die diabetische Nephropathie [87-90, 94, 95] sowie die ischämische Nierenschädigung [100, 101] und Infektionen der Harnwege [102]. Zum anderen können auch endokrinologische Faktoren (chronische ADH-Administration) [9,

49], diätetische Maßnahmen wie eine hohe Proteinaufnahme [77, 86] oder die chronische K^+ -Defizienz [49, 99], eine Schwangerschaft [23, 96, 97] und eine Hypervolämie, insbesondere durch eine Kombination aus Hochsalzdiät und Mineralokortikoiden [78], einen Wachstumsreiz darstellen. Gemeinsame Folge der meisten genannten Auslöser ist dabei die Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate. [49] Diese Hyperfiltration der kontralateralen Niere tritt zusammen mit weiteren kompensatorischen Veränderungen unmittelbar nach einer Uninephrektomie [1, 4, 50, 103, 104] auf, wobei letztlich eine Zunahme des Gewichts der verbleibenden Niere von etwa 50 % zu verzeichnen ist. [1] In diesem klassischen Fall der kompensatorischen renalen Hypertrophie basiert die Größenzunahme der Niere zumindest bei ausgewachsenen Tieren größtenteils auf einer Hypertrophie, also einer Vergrößerung der einzelnen Zellen infolge eines erhöhten RNA- sowie Proteingehalts, primär jedoch nicht auf einer Zunahme der Zellzahl (Hyperplasie). [1, 4, 45, 48, 49, 105] Hier besteht ein Unterschied zum Größenwachstum wie es z.B. bei der diabetischen Nephropathie oder bei chronischer K^+ -Depletion auftritt, da in diesen Fällen der Größenzunahme auch hyperplastische Prozesse zugrunde liegen. [9, 110] Hauser et al. [80] konnten zudem grundlegende Differenzen beim Vergleich des Transkriptoms der hypertrophierten Niere nach unilateraler Ureterobstruktion bzw. Uninephrektomie feststellen. Sowohl für die Art als auch das Ausmaß des kompensatorischen Wachstums der kontralateralen Niere besteht zusätzlich eine Abhängigkeit vom Alter der Tiere zum Zeitpunkt der durchgeführten Entfernung einer Niere. Im Gegensatz zu erwachsenen Tieren findet bei sehr jungen Tieren ein noch ausgeprägterer Anpassungsprozess statt, welcher sich in einer stärkeren Zunahme der Größe und der GFR der verbleibenden Niere ausdrückt. Während bei älteren Individuen die Hypertrophie eindeutig dominiert, spielt bei jüngeren auch die Hyperplasie, gekennzeichnet durch eine Steigerung des DNA-Gehalts im renalen Gewebe, eine Rolle. [1, 45, 58, 109, 112] Darüber hinaus konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Stärke der durch Verlust von funktionsfähigem Nierengewebe induzierten Hypertrophie eng mit dem Volumen des verbliebenen Gewebes zusammenhängt. Das kompensatorische Wachstum und die Hyperfiltration treten also umso deutlicher in Erscheinung, je mehr Nierenmasse entfernt wurde. [1, 10, 50, 111, 113] Dies belegt zum Beispiel die Studie von Santos und seinen Kollegen [111], die Versuche mit Ratten durchführten, denen in einer Operation 1/2, 2/3 bzw. alternativ 5/6 des gesamten Nierengewebes entfernt wurden. Als Maß für den Umfang der Anpassungsprozesse in Abhängigkeit von der entfernten Nierenmasse wurden die GFR sowie das Volumen des verbliebenen Gewebes herangezogen.

Im Rahmen der kompensatorischen renalen Hypertrophie kommt es sowohl zu strukturellen als auch zu funktionellen Veränderungen entlang des Nephrons. Das Größenwachstum der intakten Niere als morphologischer Anpassungsmechanismus betrifft dabei hauptsächlich die kortikalen Bereiche; am stärksten hypertrophiert somit neben dem Glomerulus das proximale Tubuluskonvolut. Für die Glomeruli konnte eine Volumenzunahme von etwa 50 %, für die proximalen Tubuli eine Durchmesser- und Längenzunahme von etwa 30 % ermittelt werden, während die Hypertrophie der distalen Tubuli nur halb so ausgeprägt war. [1, 50, 63, 113-115, 117] Mit der Vergrößerung der einzelnen Zelle und der damit verbundenen Zunahme des Gesamtproteingehalts weitet sich auch die luminale sowie basolaterale Plasmamembranoberfläche aus. [49, 50, 113] Bei der funktionellen Anpassung steht die Steigerung der GFR der verbliebenen Niere im Vordergrund, sodass bis zu 85 % der ursprünglichen Filtrationsleistung zweier Nieren aufrechterhalten werden kann. [113, 117, 119] Diese Tatsache ist letztlich die Voraussetzung der Nierenlebendspende sowie der therapeutischen Uninephrektomie bei Tumorleiden. Des Weiteren konnte passend zur morphologisch vergrößerten Resorptionsfläche eine verstärkte Aktivierung des Glucose- und Aminosäuretransports sowie des Na^+/H^+ -Antiporters und damit verbunden eine erhöhte Na^+ -Resorptionsrate im proximalen Tubulus festgestellt werden. [1, 17, 50] Die zugleich nachgewiesene Aktivitätszunahme der Na^+/K^+ -ATPase sowie der Mitochondrien bildet dabei die Basis für eine derartige Steigerung der Resorptionsleistung. [116, 120] Da der O_2 -Verbrauch der Niere physiologischerweise - abgesehen von den basalen Zellfunktionen - proportional zur Na^+ -Rückresorption ist, erklärt sich der Mehrverbrauch an O_2 in der hypertrophierten Niere aus den zuvor geschilderten adaptiven Prozessen. [118]

Das beschriebene Phänomen der kompensatorischen renalen Hypertrophie ist von großer klinischer sowie pathophysiologischer Bedeutung. Zum einen ergibt sich daraus die Möglichkeit einer Nierenlebendspende, die angesichts der hohen Prävalenz chronisch progressiver renaler Erkrankungen von besonderer Relevanz ist. [121] Zum anderen ist das kompensatorische Wachstum und die damit einhergehende Hyperfiltration langfristig mit der Entstehung und dem Fortschreiten renaler Erkrankungen assoziiert. [1, 23, 153] Als Beispiel sei hier die diabetische Nephropathie genannt. [122] Die Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen der Hypertrophie könnte zur Etablierung neuer therapeutischer Ansatzpunkte beitragen, um bei einer Verschlechterung der Nierenfunktion bereits frühzeitig eingreifen und eine Progression verlangsamen oder verhindern zu können. [19, 48, 123] Des Weiteren würden derartige Erkenntnisse Einblicke in die Regulation des Organwachstums auch beim Erwachsenen erlauben.

2.2 Fortschritte im Verständnis der kompensatorischen Hypertrophie

Aufgrund zahlreicher Untersuchungen konnten in den letzten Jahrzehnten bereits einige Wachstumsfaktoren sowie intrazelluläre Signalwege, die an der Entstehung der kompensatorischen Hypertrophie beteiligt sind, identifiziert werden. So stellt die anhand von in vivo- und in vitro-Studien gewonnene Erkenntnis, dass die Hypertrophie von proximalen Tubuluszellen infolge einer Uninephrektomie und auch bei Diabetes mellitus auf einem zellzyklusabhängigen Mechanismus beruht, einen Meilenstein in der Erforschung der zugrunde liegenden zellulären Prozesse dar. [7, 9, 48, 128] Für die Auslösung einer Hypertrophie ist in diesem Modell zunächst der Eintritt der Zellen in die G₁-Phase des Zellzyklus und die Einleitung der für diese Phase charakteristischen Prozesse, RNA- und Proteinsynthese, erforderlich. Durch Blockade des Übertritts aus dieser Wachstumsphase in die Synthese-Phase bleibt die DNA-Replikation und in der Konsequenz auch die Zellteilung aus; anstatt zu proliferieren verharrt die Zelle also in einem vergrößerten, hypertrophen Zustand. [7, 33] Die Steuerung der Zellzyklusphasen obliegt dabei periodisch aktivierbaren Proteinkinasen, den Cyclin-abhängigen Kinasen (cyclin-dependent kinases, CDKs). Diese sind nämlich nur als heterodimerer Komplex mit ihrem entsprechenden Cyclin, ein phasenspezifisch exprimiertes Protein, aktiv. [33, 125] Am G₁/S-Übergang spielen insbesondere Cyclin D und E assoziiert mit CDK4/6 bzw. CDK2 eine entscheidende Rolle. Infolge eines mitogenen Stimulus wird zunächst in der frühen G₁-Phase Cyclin D induziert, welches im Komplex mit CDK4/6 das Retinoblastoma-Protein pRB phosphoryliert. Im nichtphosphorylierten Zustand bindet pRB den Transkriptionsfaktor E2F und blockiert somit die Transkription einer Reihe von Genen. Als Folge der Anheftung von Phosphatgruppen (hypophosphorylierter Zustand) wird Cyclin E exprimiert und in der späten G₁-Phase die CDK2 aktiviert. Das Heterodimer Cyclin E/CDK2 überführt pRB in einen hyperphosphorylierten, inaktiven Status, wodurch E2F aus der Bindung freigesetzt wird und nun die Transkription verschiedener für die S-Phase notwendiger Gene stimuliert (Abb. 1.3). [9, 33, 134]

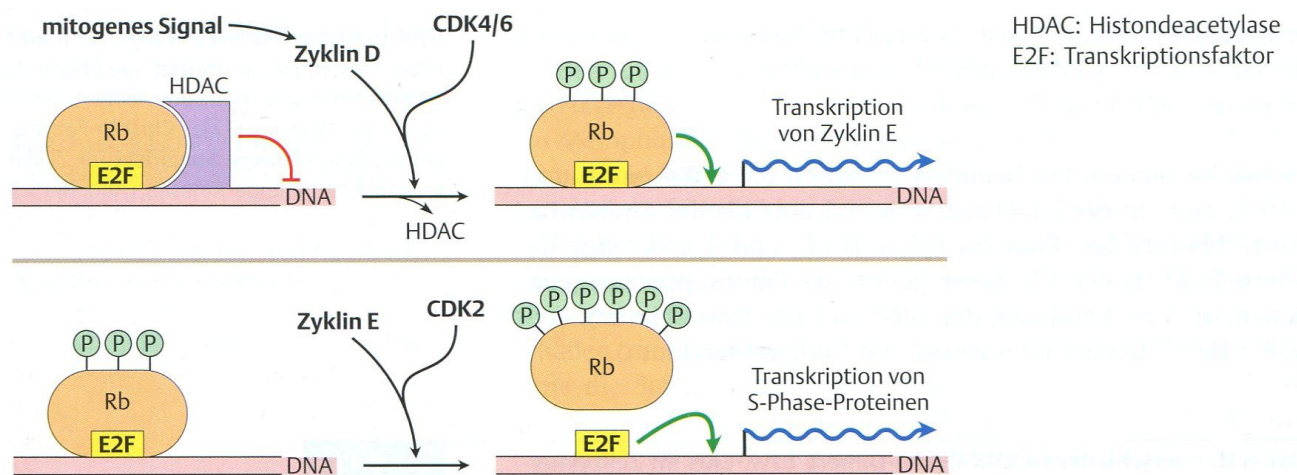


Abb. 1.3: Zellzyklus - Steuerung des G₁/S-Übergangs (aus [33])

Durch Bindung von Cyclin-Kinase-Inhibitoren (cyclin-kinase-inhibitors, CKIs) wird die Aktivität der Cyclin/CDK-Komplexe gehemmt und damit ein Zellzyklusarrest eingeleitet. Die bislang beschriebenen Inhibitorproteine werden in zwei Familien unterteilt: Die Ink4-Familie umfasst die Proteine p15^{Ink4b}, p16^{Ink4a}, p18^{Ink4c} und p19^{Ink4d}, welche spezifisch CDK4 und 6 im Komplex mit Cyclin D hemmen. Dagegen verfügt die p21/Kip-Familie, bestehend aus p21^{Cip1, Waf1, Sdi1, Cap20}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}, über ein breiteres Spektrum, indem sie die Aktivität sowohl von Cyclin D-/E- als auch Cyclin A-abhängigen Kinasen reguliert. [9, 33, 48, 127, 135] Im Kontext der Hypertrophieentstehung wird dem Transforming Growth Factor β (TGF β), ein multifunktionelles Zytokin mit antiproliferativer Wirkung, ein wesentlicher Einfluss eingeräumt. [2, 6, 9, 33, 48, 124, 129, 130, 137] Es ist bekannt, dass die durch mitogene Wachstumsfaktoren wie z.B. EGF induzierte Hyperplasie in Anwesenheit von TGF β in eine Hypertrophie konvertiert wird. TGF β führt nämlich zu einer Arretierung des Zellzyklus in der späten G₁-Phase und verhindert somit das Eintreten der Zellen in die S-Phase. Eine zentrale Rolle nimmt dabei das Protein pRB ein, das unter Einwirkung von TGF β in seinem hypophosphorylierten, aktiven Zustand persistiert, während die Hyperphosphorylierung und damit Inaktivierung unterdrückt wird. [7, 9, 25, 124, 131] Dafür konnte die supprimierte Kinaseaktivität des Cyclin E/CDK2-Komplexes bei gleichzeitig unbeeinträchtigter Aktivierung des Cyclin D/CDK4-Heterodimers verantwortlich gemacht werden. [7, 9, 25] In vivo- sowie in vitro-Untersuchungen zeigten, dass TGF β im Rahmen der Auslösung tubulärer Zellhypertrophie mit Proteinen der p21/Kip-Familie interagiert, die den G₁/S-Übergang unterbinden. Hierbei ist in vivo insbesondere das CKI-Protein p57^{Kip2} in die Regulation involviert. [9, 24, 25, 33] Daneben wird unter anderem auch den

Inhibitorproteinen p21^{Cip1} und p27^{Kip1} als Regulatoren der Cyclin E/CDK2-Kinase eine bedeutende Rolle zugeschrieben. [19, 123, 127, 128, 132, 133, 136] Abb. 1.4 veranschaulicht diese Zusammenhänge bezüglich der Entstehung der kompensatorischen Hypertrophie auf molekularer Ebene, nachdem die Zellen als Reaktion auf ein mitogenes Signal aus ihrem Ruhezustand (G₀) wieder in die G₁-Phase eingetreten sind. [7]

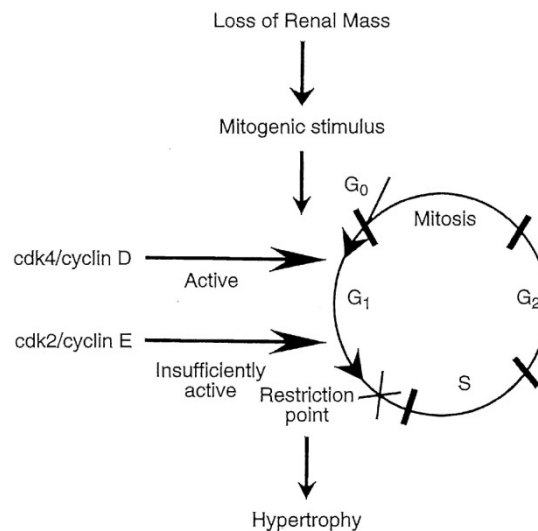


Abb. 1.4: Zellzyklusabhängige kompensatorische renale Hypertrophie (aus [7])

Darüber hinaus konnte auch für die Growth Hormone/Insulin-like Growth Factor 1-Achse eine wesentliche Beteiligung an der renalen Hypertrophieentstehung gezeigt werden. So steigt die lokale IGF1-Konzentration in der verbliebenen Niere infolge einer Uninephrektomie signifikant an, während die Serumspiegel unverändert bleiben. [88, 114, 138-143] Mittels exogen zugeführtem IGF1 konnte sogar ein GFR-Anstieg und renales Wachstum provoziert werden. [146] Umgekehrt verhindert die Gabe eines GH- bzw. IGF1-Rezeptorantagonisten das Auftreten eines kompensatorischen Nierenwachstums in Mäusen und Ratten. [114, 144, 155, 156] Des Weiteren wurden im hypertrophierten Nierengewebe erhöhte Spiegel der Wachstumsfaktoren EGF [126, 146, 147, 149] und HGF [145, 150] gemessen. Schließlich ist auch die Aktivierung des mTOR-Signalwegs von außerordentlicher Bedeutung. Eine Hemmung des ubiquitär exprimierten Proteins mTOR, ein wichtiger Regulator der Proteinsynthese, durch Rapamycin führte zu einer eindeutig verminderten Hypertrophie nach Uninephrektomie. [87, 148, 157] Außerdem war ein kausaler Zusammenhang mit der renalen Innervation auszuschließen, nachdem trotz Denervierung der verbliebenen Niere direkt nach Entnahme der kontralateralen Niere eine unbeeinträchtigte Hypertrophie nachgewiesen

werden konnte. [4, 151] Analog dazu hängt das kompensatorische Nierenwachstum weder von einer intakten Hypophyse noch Schilddrüse oder Nebenniere ab. [1, 152]

Trotz der Vielfalt neuer Erkenntnisse bleibt die genaue Funktion der Wachstumsfaktoren sowie der initiale Mechanismus, der die beschriebenen Signalwege aktiviert und somit den Gewebs- bzw. Funktionsverlust vermittelt, noch weitgehend ungeklärt.

2.3 „Workload-Hypothese“ der kompensatorischen Hypertrophie

Entsprechend der verschiedenen, zum Teil konträren Befunde wurde im Laufe der Zeit eine Reihe von Hypothesen aufgestellt. So entstanden auch multiple Theorien bezüglich des initiierenden Signals für das Nierenwachstum. Zum einen postulierte man basierend auf Experimenten an parabiotischen Tieren die Existenz eines spezifischen zirkulierenden Faktors, eines Renotropins, als Auslöser der Hypertrophie und versuchte dies anhand von in vivo- und in vitro-Versuchen zu bestätigen. [3, 4, 154] Diese Substanz ist dabei sowohl im Plasma als auch im hypertrophen Nierengewebe zu finden. [152, 171] Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die Retention von normalerweise im Urin ausgeschiedenen Produkten als Signal für das Nierenwachstum fungiert. In einer Untersuchung wurde dies z.B. in Form einer intravenösen Reinfusion von Urin getestet. [164] Die verminderte renale Elimination dieser Substanz könnte somit den Anstieg ihrer Plasmakonzentration verursachen. Andere Studien wiederum vermuten einen allgemein vorhandenen wachstumshemmenden Faktor, dessen Plasmakonzentration z.B. nach Entfernung einer Niere abnimmt und dadurch unter Wegfall des supprimierenden Einflusses das Größenwachstum zustande kommen kann. [152, 172] Eine ganz zentrale Bedeutung ist in diesem Zusammenhang auch der schon um 1900 formulierten und äußerst populären „workload“-Hypothese der renalen Hypertrophie einzuräumen. [166, 167] Hier wird die Zunahme der GFR als mögliches wachstumsauslösendes Ereignis in der frühen Phase der kompensatorischen renalen Hypertrophie angesehen. Aus dieser glomerulären Hyperfiltration im Rahmen der funktionellen Anpassungsvorgänge nach Verlust von Nierengewebe resultiert nämlich eine Mehrbelastung des proximalen Tubulus. Die dabei auftretende erhöhte Belastung der verbliebenen Nephrone könnte letztlich die Hypertrophie der proximalen Tubuluszellen anstoßen. [1, 49, 61, 88, 165] Gestützt wird diese Hypothese durch zahlreiche Untersuchungen, die belegen, dass die funktionellen Veränderungen zeitlich vor den strukturellen Kompensationsmechanismen in Form der Hypertrophie auftreten. [1, 4, 49, 103, 161, 162] Astoin und Altman [160] untersuchten die frühen hämodynamischen

Veränderungen, indem sie an narkotisierten Hunden unmittelbar nach der Entnahme einer Niere Messungen des renalen Blutflusses (RBF) sowie der GFR der verbliebenen Niere durchführten. Bereits innerhalb der ersten Minuten nach UNx sind Zunahmen um 10 % (RBF) bzw. 20 % (GFR) beschrieben. In einer anderen Studie war ebenfalls am Hund eine nahezu sofort nach UNx einsetzende renale Vasodilatation zu beobachten. Darüber hinaus bestätigte sich die rasche funktionelle Anpassung auch bei Ratten, indem ein GFR-Anstieg innerhalb von 90 min nachgewiesen werden konnte. [162, 163] Angesichts der Tatsache, dass sämtliche der unter 2.1 erwähnten Ursachen der Hypertrophie mit einer Steigerung der GFR einhergehen, liegt die Annahme einer Assoziation mit dem Nierenwachstum nahe. [45, 49] Allerdings konnte bislang noch nicht definitiv gesichert werden, welche Faktoren den Anstieg der GFR bewirken sowie vor allem über welche Mechanismen die glomeruläre Hyperfiltration eine Tubulushypertrophie induzieren kann. Nachdem der verstärkte tubuläre Fluss ein gesteigertes Substratangebot mit sich bringt, war auch eine Zunahme der Transporteraktivität anzunehmen. Tatsächlich konnte neben der erhöhten Kapazität weiterer Transporter eine Stimulation des Na^+/H^+ -Antiporters in der Bürstensaummembran als frühes Ereignis im Rahmen der kompensatorischen renalen Hypertrophie identifiziert werden. [17] Im Hinblick auf eine enge Assoziation von NHE_3 -Stimulation und Mitogenese in verschiedenen Zelltypen ist die Transporteraktivierung als lokaler Stimulus durchaus in Betracht zu ziehen. [16] Der Nachweis eines kausalen Zusammenhangs zwischen der Na^+/H^+ -Austauscheraktivität und dem Nierenwachstum bedarf jedoch weiterer Experimente. [17, 49] Möglicherweise führt auch der vermehrte Resorptionsaufwand und der damit verbundene Energieverbrauch zur Hypertrophie der proximalen Tubuli. [61] Anhand des Modells der chronischen Glomerulonephritis mit heterogener Schädigung der Nephrone ergaben sich zudem Hinweise auf die Beteiligung eines lokalen Faktors als Bindeglied zwischen GFR-Anstieg und auftretender renaler Hypertrophie. [49] Man stellte nämlich fest, dass denjenigen Nephrone mit hyperfiltrierenden, großen Glomeruli entsprechend vergrößerte, hypertrophe Tubuli zuzuordnen waren, während in anderen Nephrone kleine Tubuli vorlagen. Diese Beobachtung untermauert die These der lokalen Sekretion einer auto- oder parakrin auf das Wachstum wirkenden Substanz, da ansonsten alle Nephrone gleichermaßen betroffen wären. [168, 169] Insgesamt ist die renale Hypertrophie wahrscheinlich das Resultat eines komplexen Zusammenspiels verschiedener Komponenten.

3. Die Familie der natriuretischen Peptide

3.1 Vorversuche zur Bedeutung der NPs im Rahmen der kompensatorischen renalen

Hypertrophie

Unter Berücksichtigung der bereits beschriebenen funktionellen Anpassungsmechanismen im Rahmen der kompensatorischen Hypertrophie sowie der im Weiteren (unter 3.5) vertieften physiologischen Wirkungen der NPs ist die Vermutung einer Beteiligung der NPs durchaus nachvollziehbar. Die vorausgehende Dissertationsarbeit von Dr. Andrea Schreiber [179] befasste sich dabei insbesondere mit der Identifizierung des/r zirkulierenden Faktors/en (vgl. 2.3), d.h. des die Hypertrophie auslösenden initialen Mechanismus. Anhand von in vivo-Untersuchungen an Mäusen mit deletierter Guanylatzyklase-A, dem gemeinsamen Rezeptor von ANP, BNP, DNP und Urodilatin, konnte die Bedeutung des GC-A-Signalwegs hauptsächlich in der frühen Phase der kompensatorischen renalen Hypertrophie nachgewiesen werden. So kam es bei Wt-Mäusen wenige Tage nach UNx zu einer ausgeprägten Funktionssteigerung und einer deutlichen Gewichtszunahme der verbliebenen Niere, während diese Effekte bei GC-A-KO-Mäusen nahezu aufgehoben waren. Dabei scheint im Rahmen der systemischen, indirekten Wirkung der NPs, also über einen Anstieg der GFR, vor allem BNP das relevante Hormon zu sein, wohingegen ANP weitgehend ausgeschlossen werden konnte. Dafür sprach zum einen der Anstieg der BNP-Plasmakonzentration bei uninephrektomierten Wt-Mäusen sowie zum anderen die unbeeinträchtigte Kompensation nach UNx bei ANP-KO-Mäusen. Im Rahmen dieser Arbeit stellte man darüber hinaus auch in vitro die Möglichkeit der flussabhängigen Induktion einer Hypertrophie fest und erhielt ebenso Hinweise auf einen zusätzlichen direkten Einfluss der NPs auf das Größenwachstum der proximalen Tubuluszellen (PTC). U.a. wurden parallel PTC aus Nieren von Wildtypmäusen und PTC aus GC-A-KO-Mäusen einer 24-stündigen Superfusion (1 mm/s) unterzogen (ausführliche Beschreibung der Vorrichtung unter II., 3.) und anschließend das Protein/DNA-Verhältnis als Maß für die ausgelöste Hypertrophie bestimmt. Wie aus Abb. 1.5 hervorgeht, nahm die Protein/DNA-Ratio der Wildtyp-Zellen infolge der Perfusion um 44 % zu, während die analog behandelten GC-A-KO-Zellen keine signifikante Zunahme der Zellgröße nach Perfusion zeigten. Demnach geht das Fehlen des gemeinsamen Rezeptors der NPs auch mit dem Verlust der Fähigkeit zur flussinduzierten Hypertrophie einher.

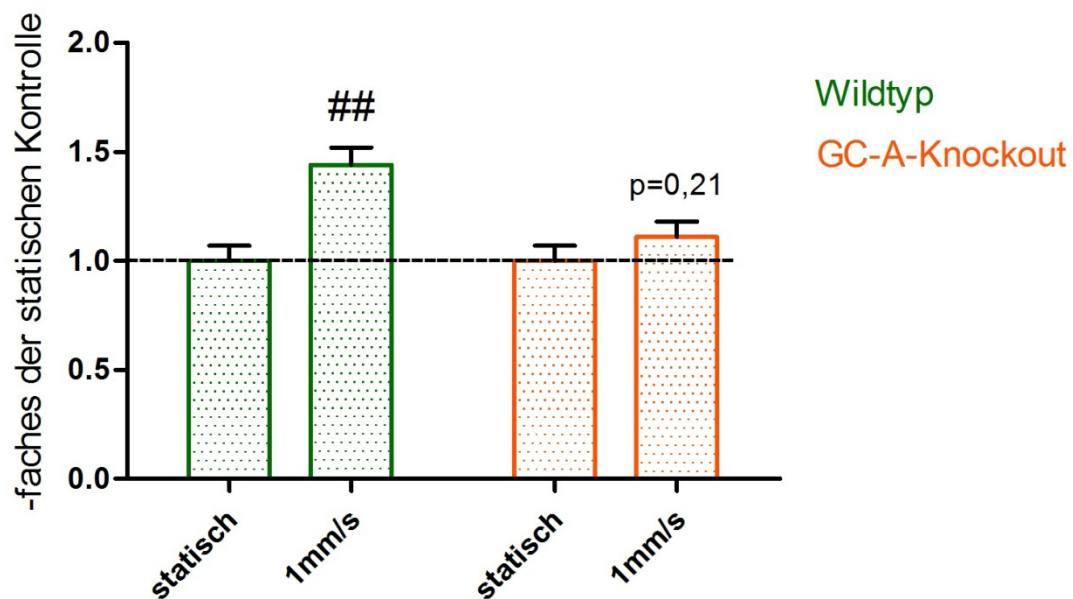


Abb. 1.5: Protein/DNA-Verhältnis von PTC statisch bzw. nach Perfusion (24 h, 1 mm/s): Wildtyp-Zellen vs. GC-A-Knockout-Zellen (Relativwerte), n = 4
p < 0,001 vs. statischer Kontrolle

Basierend auf den dargestellten Vorbefunden von Dr. Andrea Schreiber stellte sich nun die Frage, ob die NPs möglicherweise nicht nur systemisch als initiiierende Faktoren eine Rolle spielen, sondern auch ihre lokale Sekretion und unmittelbare Wirkung auf den proximalen Tubulus als Folge der Steigerung der GFR bei der Induktion der Hypertrophie von Bedeutung ist. Die vorliegende Arbeit sollte eben diese Hypothese schwerpunktmäßig für ANP und Urodilatin überprüfen.

Nachdem die natriuretischen Peptide im Zentrum der angestellten Überlegungen stehen, sollen im Folgenden zunächst ihre Struktur, Synthese und Elimination sowie der Signalweg und ihre biologischen Wirkungen dargelegt werden. Besonderes Augenmerk wird hierbei auf die kardialen NPs ANP und BNP sowie das alternative Spaltprodukt der Niere - Urodilatin - gelegt.

3.2 Systematik und Struktur der natriuretischen Peptide

Bei den natriuretischen Peptiden handelt es sich um eine Familie von Peptidhormonen, die sowohl über einen endokrinen als auch para- bzw. autokrinen Wirkungsmechanismus verfügen. Zu dieser Gruppe gehören insbesondere das atriale natriuretische Peptid (ANP), das B-Typ natriuretische Peptid (BNP), das C-Typ natriuretische Peptid (CNP), Urodilatin sowie

das Dendroaspis natriuretische Peptid (DNP). [8, 33] Nachdem im Jahre 1981 von de Bold et al. durch i.v. Injektion eines atrialen Extrakts bei Ratten eine rasche Blutdrucksenkung sowie eine gesteigerte Diurese und Natriurese ausgelöst werden konnte, war die Grundlage für die Entdeckung des ersten NPs - später als ANP bezeichnet - sowie für ein größeres wissenschaftliches Interesse auf diesem Gebiet bereitet. [173] In den folgenden Jahren gelang es schließlich BNP [174] und CNP [175] aus dem Gehirn von Schweinen zu extrahieren und Urodilatin [177] in menschlichem Urin zu identifizieren. Erst 1992 wurde DNP aus dem Gift der grünen Mamba (*Dendroaspis angusticeps*) isoliert. [176] Als strukturelle Gemeinsamkeit weisen alle NPs einen aus 17 Aminosäuren bestehenden und über eine Disulfidbrücke zweier Cysteine geschlossenen Ring auf, dessen Sequenz zwischen den verschiedenen NPs konserviert (CFGXXXDRIXXXXGLGC - X steht hier für eine beliebige Aminosäure) und für die biologische Aktivität von entscheidender Bedeutung ist. [178] Die amino- und carboxyterminalen Aminosäureketten außerhalb der Ringstruktur unterscheiden sich dagegen sowohl in ihrer Länge als auch in der Sequenz. [15] Abb. 1.6 veranschaulicht die Aminosäuresequenzen der NPs schematisch.

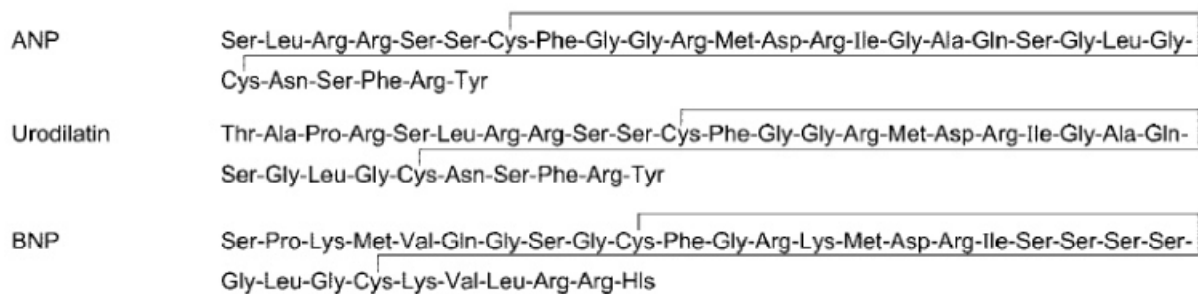


Abb. 1.6: Aminosäuresequenzen der natriuretischen Peptide ANP, Urodilatin und BNP mit eingezeichneten Disulfidbrücken (aus [8])

3.3 Synthese und Mechanismen der Elimination natriuretischer Peptide

Auch wenn die NPs strukturell recht ähnlich aufgebaut sind, werden die jeweiligen Vorläuferpeptide dennoch durch eigenständige Gene codiert. [22] In Abb. 1.7 ist der Ablauf der unter den NPs am besten untersuchten Bildung von ANP dargestellt. Der Syntheseprozess nimmt seinen Ausgang von dem Gen NPPA, das sich beim Menschen auf Chromosom 1 befindet und 3 Exons umfasst. Bei der Translation der etwa 1 kbp messenden transkribierten mRNA entsteht zunächst das aus 151 Aminosäuren bestehende Vorläuferpeptid Prä-Pro-ANP, von dem nach N-terminaler Abspaltung des Signalpeptids am ER das 126 Aminosäuren große Pro-ANP übrig bleibt. Nach erfolgter posttranslationaler Modifikation wird das gebildete Pro-

ANP bis zu seiner Freisetzung in Form von Sekretgranula gespeichert. Durch proteolytische Spaltung mittels der transmembranen Serinprotease Corin im Rahmen der Sekretion entsteht neben einem N-terminalen Fragment die biologisch aktive Form des ANP aus den carboxyterminalen 28 Aminosäuren. Wie bereits aus der Namensgebung abzuleiten ist, findet die Synthese des ANP zwar hauptsächlich in den kardialen Myozyten der Atrien statt, darüber hinaus aber auch in einer Vielzahl anderer Gewebe - insbesondere auch der Niere. [13, 22, 187-189] Bei Expression des NPPA-Gens besteht ausschließlich in der Niere durch alternative Prozessierung des ANP-Vorläuferpeptids die Möglichkeit der Bildung eines aus 32 Aminosäuren aufgebauten Peptids, genannt Urodilatin, das sich vom ANP nur durch 4 zusätzliche N-terminale Aminosäuren unterscheidet. [177, 182, 190] Mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen konnten Saba et al. ANP im proximalen Tubulus lokalisieren, Urodilatin hingegen v.a. im distalen Tubulus. Ein Radioimmunoassay wies außerdem die Anwesenheit des Prohormons, die gemeinsame Vorstufe von ANP und Urodilatin, sowohl im proximalen als auch im distalen Tubulus nach. [20, 183] Diese Kolo-kalisation von Urodilatin und des Propeptids im distalen Tubulus bestätigt den renalen Ursprung von Urodilatin. Darüber hinaus ergab die Bestimmung der Konzentration natriuretischer Peptide in Homogenisaten menschlicher Nieren durch Herten et al. für Urodilatin wesentlich höhere Werte als für das hauptsächlich im distalen Tubulus lokalisierte BNP und CNP (100- bzw. 10fach). [181] Umgekehrt zirkuliert Urodilatin nur in äußerst geringen Konzentrationen im Blut (9-12 pg/ml). [184] Des Weiteren konnte man sowohl infolge einer 5/6 Nephrektomie bei Ratten eine Heraufregulation des NPPA-Gens im verbliebenen Nierengewebe feststellen [185] als auch bei Ratten mit beginnendem Nierenversagen im Rahmen eines Typ II Diabetes mellitus [186]. In der Zusammenschau legen diese Befunde neben der klassischen hormonellen Wirkung von ANP para- oder autokrine Effekte von ANP und Urodilatin in der Niere besonders auch im Zusammenhang mit der kompensatorischen Hypertrophie nahe.

Analog zur ANP-Synthese erfolgt auch die Bildung von BNP über ein aus 134 Aminosäuren bestehendes Präprohormon. Allerdings wird das beim Menschen auf Chromosom 1 lokalisierte NPPB-Gen neben einer atrialen Expression vorwiegend in den Kardiomyozyten der Ventrikel transkribiert. Das nach Abspaltung des Signalpeptids entstehende 108 Aminosäuren lange Pro-BNP wird nur in atrialen Granula zusammen mit Pro-ANP gespeichert, während seine Produktion im Ventrikel bereits auf Transkriptionsebene unter dem Einfluss des Transkriptionsfaktors GATA4 reguliert wird. Am Ende steht die Freisetzung des biologisch aktiven carboxyterminalen Spaltprodukts sowie eines inaktiven N-terminalen

Fragments (NT-Pro-BNP). Das aktive BNP weist eine speziesspezifische Länge seiner Aminosäurekette auf: humanes BNP besteht aus 32 Aminosäuren, das der Maus dagegen aus 45 Aminosäuren. Physiologischerweise ist die Expression des BNP-Gens im Herzen geringer als die des ANP-Gens, sodass die im Plasma eines Gesunden messbare BNP-Menge nur etwa 1/10 der ANP-Konzentration beträgt. Im Rahmen einer kardialen Belastung z.B. bei Herzinsuffizienz steigt allerdings die BNP-Konzentration um ein Vielfaches an und korreliert dabei mit dem Schweregrad der Erkrankung, was seine Eignung als diagnostischer und prognostischer Parameter begründet. [8, 13, 15, 22, 187, 191] Darüber hinaus konnte mittels in vitro-Studien eine ANP- und BNP-Expression bei primären proximalen Tubuluszellen der Ratte nachgewiesen werden. Die beschriebene endogene Produktion unter anderem von BNP lässt somit neben seiner systemischen Wirkung ebenfalls die Vermutung eines lokalen Einflusses auf das Nierenwachstum zu. [158]

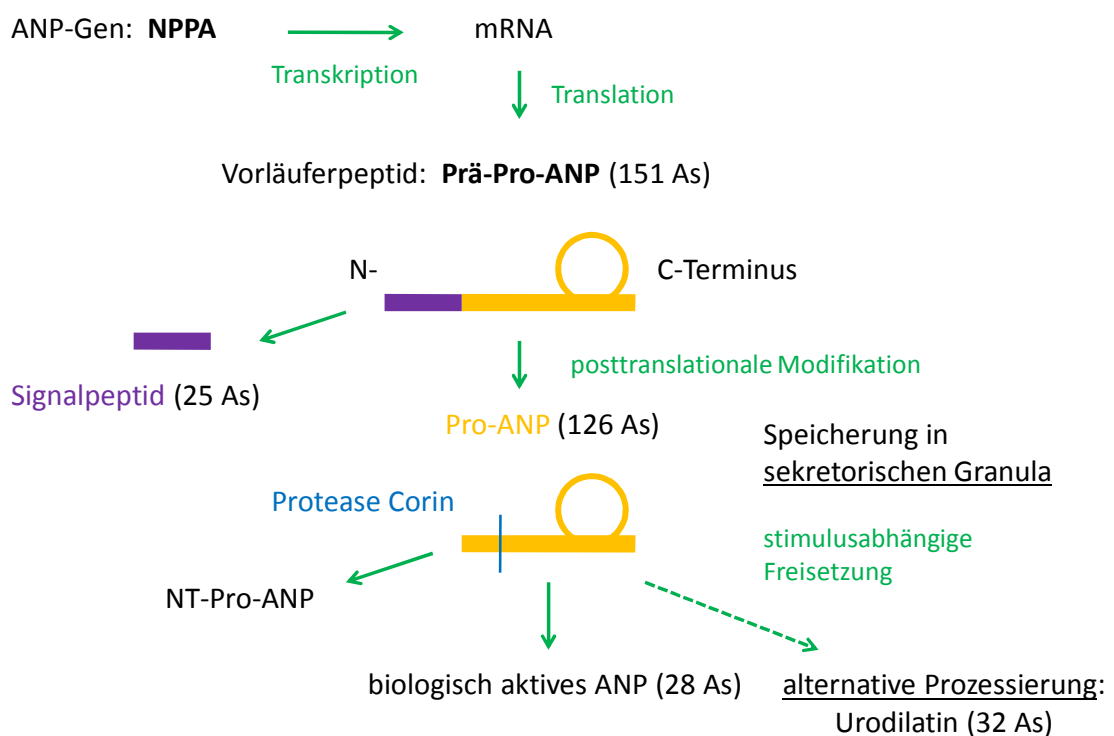


Abb. 1.7: Gemeinsamer Syntheseweg des biologisch aktiven ANPs sowie des Urodilatins

Als dominierender Stimulus der Exozytose der kardialen ANP-Speichervesikel ist die Dehnung des atrialen Myokards z.B. als Ausdruck eines erhöhten intravasalen Volumens anzusehen. Neben dem mechanischen Reiz führen allerdings auch zahlreiche endokrine

Faktoren zu einer vermehrten Bildung und Freisetzung von ANP und BNP. [22, 193] Dies sind u.a. Glucocorticoide [194], Katecholamine [195], Endothelin-1 [196] und Angiotensin II [197].

Sowohl die zirkulierende als auch lokale Konzentration an biologisch aktivem ANP und BNP im Organismus wird zum einen über das Ausmaß der Synthese und Sekretion gesteuert, zum anderen durch den Abbau der NPs vorwiegend auf zwei verschiedene Arten:

Unter physiologischen Bedingungen überwiegt die Inaktivierung durch den natriuretischen Peptidrezeptor C (NPR-C), der entsprechend seiner Hauptfunktion auch als Clearance-Rezeptor bezeichnet wird. [198] Dieser rezeptorassoziierte Abbauweg beinhaltet die rezeptorvermittelte Internalisierung und lysosomale Degradierung der NPs mit anschließendem Recycling des Rezeptors unter Wiedereinbau in die Zellmembran. [11, 13, 210] Eine Expression von NPR-C ist für sämtliche Gewebe, u.a. auch für die Niere, beschrieben. Dabei können alle bekannten NPs mit unterschiedlicher Affinität an die extrazelluläre Domäne gebunden werden, wobei ANP die höchste, BNP die geringste Bindungsneigung aufweist. Daraus könnte die mit etwa 2 min etwas kürzere Plasma-HWZ des ANP im Vergleich zum BNP - ca. 20 min - resultieren. [13, 15, 211] Neben seiner Bedeutung im Katabolismus der NPs bestehen zudem auch Hinweise auf zusätzliche biologische Wirkungen des NPR-C wie beispielsweise im Rahmen der Signaltransduktion. [199] So wird über eine Hemmung der Adenylatcyclaseaktivität in Membranen bzw. Reduktion der cAMP-Konzentration in Zellen durch einen NPR-C-selektiven Agonisten berichtet. [200]

Bei pathologisch erhöhten Konzentrationen der NPs gewinnt der alternative Abbaumechanismus über enzymatische Spaltung zunehmend an Bedeutung. [198] Da eine intakte Ringstruktur für die biologische Aktivität absolut essentiell ist, muss diese zur Inaktivierung stets aufgebrochen werden. [201] Die neutrale Endopeptidase NEP 24.11, auch als Neprilysin oder Enkephalinase bezeichnet, ist eine membrangebundene zinkabhängige Metallopeptidase, die den Ring des ANP z.B. zwischen Cystein und Phenylalanin nahe der Disulfidbrücke durch hydrolytische Spaltung öffnet. [202, 203] Es handelt sich um ein weit verbreitetes Enzym mit einer großen Bandbreite an Substraten, das insbesondere in Gehirn, Lunge, Hoden, Niere und Endothelzellen zu finden ist. In der Niere wiederum konnte der Großteil im Bürstensaum des proximalen Tubulus juxtamedullärer Nephrone lokalisiert werden. [204-206] Analog zum Abbau durch den NPR-C ist ANP auch gegenüber einer Degradierung durch die NEP verglichen mit Urodilatin und BNP am empfindlichsten. [207, 212] So konnten Abassi et al. z.B. zeigen, dass die Anwendung eines NEP-Inhibitors zwar die

Elimination von ANP drastisch senkte, jedoch keinen Einfluss auf den Abbau von Urodilatin hatte. [208] Untersuchungen zum äußerst resistenten BNP machten zudem ein Zusammenwirken zweier transmembraner Peptidasen, Meprin A und NEP, für die rasche renale Elimination verantwortlich. [209] Diese Befunde stehen dabei im Einklang mit den bereits erwähnten HWZen der NPs.

3.4 Rezeptoren der natriuretischen Peptide, Signaltransduktion sowie Regulation der GC-A-Aktivität

Die NPs entfalten ihre biologischen Wirkungen, indem sie mit einer Gruppe von Rezeptoren, den natriuretischen Peptidrezeptoren, auf der Oberfläche ihrer Zielzellen interagieren. Diese Rezeptorfamilie umfasst neben dem bereits unter 3.3 beschriebenen Clearance-Rezeptor NPR-C insbesondere die natriuretischen Peptidrezeptoren A und B (NPR-A/-B), zwei plasmamembrangebundene Guanylatcyclasen. Während NPR-A sowohl ANP als auch mit geringerer Affinität BNP bindet, stellt CNP den physiologischen Liganden des NPR-B dar. [13, 22, 213] Im Folgenden soll der im Rahmen dieser Arbeit bedeutsamste Rezeptor NPR-A, auch als Guanylatcyclase-A (GC-A) bezeichnet, näher beleuchtet werden. Die Expression des NPR-A ist in zahlreichen Geweben verbreitet, wobei sie in der Niere, Nebenniere, Lunge sowie im Herzen und den großen Gefäßen dominiert. [13, 22, 222] Strukturell setzt sich der NPR-A ebenso wie der NPR-B aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer hydrophoben Transmembranregion und einem intrazellulären Anteil zusammen. Letzterer gliedert sich wiederum in eine kinaseähnliche Domäne (KLD), die über eine Gelenkregion mit der C-terminalen Guanylatcyclase-Domäne verbunden ist. [22, 213]

Gemäß eines Modells zur Aktivierung der GC-A durchläuft der Rezeptor bei der Signaltransduktion nacheinander drei verschiedene Zustände. In der zu Beginn vorliegenden basalen Form - unter Abwesenheit der NPs - liegt der NPR-A als Oligomer mit mindestens 6 phosphorylierten Aminosäuren im Bereich der kinaseähnlichen Domäne und somit unterdrückter GC-Aktivität vor. Infolge der Ligandenbindung wird der Rezeptor in die aktive Form überführt; es kommt zur Konformationsänderung innerhalb der extrazellulären Domäne und anschließenden Weiterleitung des Signals über die Plasmamembran ins intrazelluläre Kompartiment. Dadurch verliert zum einen die KLD ihren supprimierenden Einfluss auf die GC-Domäne, wodurch ihre Dimerisierung eingeleitet und die Bildung des second messengers cGMP aus GTP unter Abspaltung von Pyrophosphat am aktiven Zentrum katalysiert wird. Zum anderen resultiert daraus eine reduzierte Affinität der Ligandenbindungsdomäne zu ANP

bzw. BNP und damit verbunden eine erhöhte Dissoziationsrate. Darüber hinaus werden durch eine Konformationsänderung der KLD die angehängten regulatorischen Phosphatreste exponiert, sodass eine spezifische Phosphatase die Dephosphorylierung des Rezeptors mit Unempfindlichkeit gegenüber weiterer Hormonstimulation bewirkt (desensibilisierter Zustand). Die Freisetzung des Liganden sowie die erneute Phosphorylierung der GC-A führen wieder den ursprünglichen basalen Zustand herbei. [13, 192, 227] Dabei ist die Phosphorylierung der KLD essentielle Voraussetzung für eine hormonelle Aktivierung des NPR-A. [223]

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass nach Hinzufügen von ATP zum Reaktionsansatz ein drastischer Anstieg der ANP-abhängigen GC-Aktivität zu verzeichnen ist. [214, 215] Letztlich wurde sogar die Unverzichtbarkeit des ATP bei der Aktivierung des NPR-A festgestellt. [216, 217] Laut derzeitigem Kenntnisstand ermöglicht nämlich erst die Anwesenheit eines Liganden die ATP-Bindung an die KLD, wodurch folglich wie oben beschrieben das aktive Zentrum der GC-Domäne geformt wird. [13]

Zum besseren Verständnis der Regulation der hormonabhängigen GC-A-Aktivität bedarf es weiterer Forschung; nach bisherigem Wissen sind allerdings hauptsächlich fünf verschiedene Mechanismen [192] involviert:

Nachdem der NPR-C wie bereits erwähnt die Konzentration der vorhandenen NPs moduliert, könnte eine veränderte Expression des Clearance-Rezeptors die GC-A-vermittelten Effekte von ANP bzw. BNP beeinflussen. [192] Von ganz zentraler Bedeutung für die Aktivierung der GC-A ist der Phosphorylierungszustand des Rezeptors innerhalb der KLD. Eine chronische Exposition des Rezeptors gegenüber NPs reduziert die hormonabhängige GC-Aktivität. [13] Dabei liegt dieser Desensibilisierung wahrscheinlich eine durch ANP induzierte Dephosphorylierung der KLD zugrunde. [228] Auch einige andere Substanzen wie z.B. Angiotensin II und Endothelin vermindern die Empfindlichkeit der GC-A, wobei hier vermutlich eine Proteinkinase C-vermittelte Dephosphorylierung verantwortlich ist. [230, 231] Nach Bindung an die entsprechenden Oberflächenrezeptoren kommt es nämlich zur Aktivierung eines G-Proteins und Stimulation der Phospholipase C. Das dabei gebildete Diacylglycerol bindet und aktiviert nun die Proteinkinase C, welche ein bislang noch unbekanntes Protein phosphoryliert und damit wiederum aktiviert, was schließlich in eine Dephosphorylierung der GC-A mündet. [230] Ein weiteres bislang sehr umstrittenes Phänomen, das ebenfalls zur ANP-abhängigen Herunterregulation der GC-A beitragen könnte, ist die Internalisierung von Ligand-Rezeptor-Komplexen. [192] So konnten Pandey und seine Kollegen in ihrer Arbeit mit verschiedenen Zelllinien zeigen, dass die durch ANP-

Bindung induzierte Internalisierung größtenteils mit der Degradierung des Rezeptors verbunden ist, während nur ein kleiner Anteil für den Einbau in die Plasmamembran wiederverwendet wird. [224-226] Des Weiteren kann die extrazelluläre Osmolalität als wichtiger Faktor im Rahmen der Regulation der GC-A-Aktivität betrachtet werden. [219, 229, 232] Veränderungen des Milieus insbesondere in der Niere greifen dabei höchstwahrscheinlich auf Expressionsebene und über die Empfindlichkeit des Ansprechens sowohl des NPR-A als auch NPR-C ein. Nicht zuletzt spielt neben den vorgestellten posttranskriptionellen Mechanismen auch die Regulation der Gentranskription selbst eine wichtige Rolle für die Rezeptoraktivität. [192] Eine länger anhaltende ANP-Stimulation ist in vitro mit einem verminderten GC-A-mRNA-Gehalt sowie einer reduzierten Zahl an Rezeptoren verbunden. [233] Für eine Reihe von Zelltypen konnte die cGMP-Produktion als Auslöser der ANP-abhängigen GC-A-mRNA-Herunterregulation identifiziert werden. [234, 235]

Letztlich wird das Ausmaß der durch ANP und BNP vermittelten Wirkungen auf sehr komplexe Weise durch das Zusammenwirken zahlreicher Prozesse reguliert. Vereinfacht lässt sich jedoch festhalten, dass sowohl die Modulation der Konzentration der NPs als auch die Aktivität und Zahl der NPR-As wichtige Stellschrauben in der Regulation darstellen.

Über den im Rahmen der Signaltransduktion auftretenden cGMP-Anstieg werden schließlich die Effekte der NPs auf die verschiedenen Organe vermittelt. Hierbei sind drei cGMP-bindende Effektoren beschrieben. Die am besten untersuchten cGMP-induzierten Wirkungen werden indirekt über die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase G (PKG), einer Serin-/Threoninkinase, von der sowohl eine lösliche als auch eine membrangebundene Isoform bekannt ist, ausgelöst. [13, 22, 33, 220] In der Niere konnte in hoher Konzentration die membrangebundene Form nachgewiesen werden, während z.B. in Kardiomyozyten die cytoplasmatische PKG zu finden ist. [13] Des Weiteren steuert der intrazelluläre Botenstoff cGMP die Aktivität einer Reihe von Phosphodiesterasen, welche cGMP mittels Umwandlung in GMP inaktivieren und somit die cGMP-Konzentration regulieren. [13, 22, 33, 221] Schließlich verfügt cGMP auch über eine direkte Wirkung durch Bindung an die C-terminale Domäne sog. cyclic nucleotide-gated (CNG-) Ionenkanäle mit Einfluss auf ihre Offenwahrscheinlichkeit. Es handelt sich dabei um nicht-selektive Kationen-Kanäle, welche auch in der Niere exprimiert sind. [13, 22, 33, 218] Abb. 1.8 stellt die unter 3.3 und 3.4 abgehandelten Angriffspunkte der NPs an ihren Zielzellen zusammenfassend am Beispiel des ANP dar und verschafft zugleich einen groben Überblick zur Signaltransduktion.

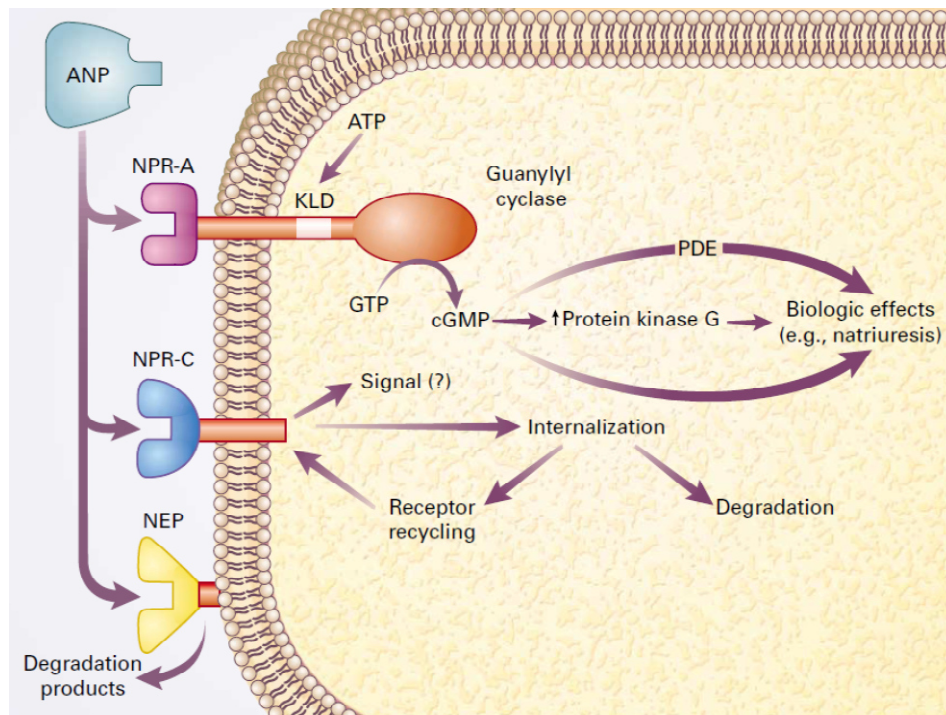


Abb. 1.8: Schematische Darstellung der Angriffspunkte von ANP an der Zielzelle (ebenso gültig für BNP) sowie der Signaltransduktion (aus [22])

3.5 Physiologische Wirkungen der natriuretischen Peptide

Die natriuretischen Peptide ANP und BNP nehmen über die Bindung an den NPR-A und die damit verbundene cGMP-Bildung auf sämtliche Organe des Organismus Einfluss und steuern dadurch wichtige physiologische Prozesse. Im Folgenden sollen nur die wesentlichen Funktionen der NPs, mit den renalen Auswirkungen als Schwerpunkt, herausgegriffen und ihr Zusammenhang dargestellt werden.

Eine ganz zentrale Rolle spielen die NPs im Kontext der Regulation des basalen arteriellen Blutdrucks sowie des intravaskulären Blutplasmavolumens durch ihre kombinierte Wirkung auf Gefäße, Niere und Nebenniere. [13, 22] Die ANP-abhängige Senkung des Blutdrucks basiert zu einem gewissen Teil auf der Reduktion der kardialen Vorlast durch Austritt von Plasma ins extravaskuläre Kompartiment. [237] Die zugrunde liegende erhöhte Endothelpermeabilität unter Einfluss von ANP fand in Versuchen an Mäusen mit selektivem „knock-out“ des NP-Rezeptors im Endothel (EC GC-A KO) seine Bestätigung. So konnten Wildtypmäuse eine akute Flüssigkeitszufuhr problemlos ausgleichen, während bei EC GC-A KO-Mäusen der zentrale Venendruck als Maß für das intravasale Volumen zunächst deutlich anstieg. [236] Des Weiteren weisen EC GC-A KO-Mäuse grundsätzlich ein erhöhtes Plasmavolumen sowie einen leichten arteriellen Hypertonus auf. [238] Die glatte Muskulatur

der Gefäße stellt einen weiteren Angriffspunkt der NPs dar. Eine Aktivierung des NPR-A führt hier durch Relaxation und folglich eintretende Vasodilatation ebenfalls zum raschen Abfall des Blutdrucks. In Mäusen mit selektivem Fehlen des NPR-A in den glatten Gefäßmuskelzellen tritt dagegen nach ANP-Bolusinjektion keine vergleichbare Blutdrucksenkung ein. [239] Die beschriebenen peripheren Effekte werden ergänzt durch eine zentrale Hemmung des Durstgefühls sowie Salzappetits. [240, 241] Durch Einwirkung der NPs auf den Hirnstamm und daraus resultierender Inhibition der Sympathikusaktivität kann ebenfalls auf den Blutdruck senkend Einfluss genommen werden. [242] Von ganz besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang allerdings die Aktivierung des NPR-A in der Niere, welche eine Diurese und Natriurese nach sich zieht. [13, 22] Diese renale Wirkung konnte in verschiedenen Studien durch Infusion von ANP bzw. BNP mit nachfolgender verstärkter Harn- und Na^+ -Ausscheidung belegt werden. [243-245] Wie in Abb. 1.9 skizziert ist die Stimulation der Diurese die Folge eines Zusammenspiels von glomerulären und direkten tubulären Effekten sowie einer Beeinflussung der juxtaglomerulären Zellen. [13] Eine wesentliche Wirkung des ANP ist die Erhöhung des hydrostatischen Drucks in den glomerulären Kapillaren durch Vasodilatation der afferenten Arteriole bei gleichzeitiger Konstriktion der efferenten Arteriole. Derart veränderte hämodynamische Verhältnisse sind schließlich mit einer Zunahme der GFR assoziiert. [246, 248] Des Weiteren wird durch Regulationsmechanismen, die unmittelbar am Tubulus ansetzen, die Rückresorption von Wasser und Na^+ gehemmt und damit ebenfalls die Diurese und Natriurese gefördert. Dabei wirkt ANP hauptsächlich auf das proximale Konvolut und in den Sammelrohren, indem es cGMP-abhängig die Aktivität von Na^+ -Kanälen und Transportern moduliert sowie die Wirkung von Vasopressin antagonisiert. [247, 249, 265] BNP dagegen entfaltet neben dem Einfluss am proximalen Tubulus seine Hauptwirkung in den distalen Nephronsegmenten. [244, 245] Im Rahmen der direkten tubulären Wirkungsweise könnte auch die lokale Produktion natriuretischer Peptide wie beispielsweise ANP oder Urodilatin involviert sein und parakrin die Salz- und Harnausscheidung stimulieren. [177] Im Vergleich zu ANP reichten in Versuchen mit Urodilatin bereits geringere Dosen aus, um eine Steigerung der Diurese auszulösen. [250] Schließlich erhöht ANP die Volumenausscheidung auch indirekt über die Hemmung der Reninsekretion der juxtaglomerulären Zellen und die damit einhergehende Antagonisierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). [13, 253] Daneben inhibiert ANP allerdings die Aldosteronfreisetzung auch durch einen direkten Effekt auf die Nebennierenrinde. [251, 252]

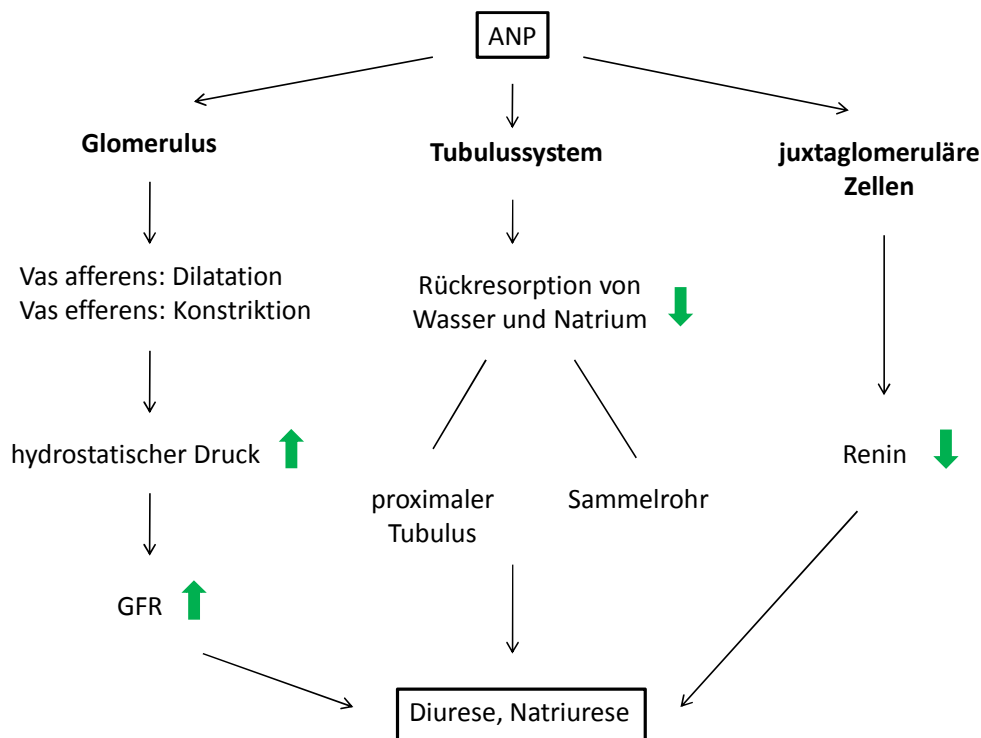


Abb. 1.9: Stimulation der Diurese und Natriurese durch Aktivierung des NPR-A

Beobachtungen an GC-A- bzw. ANP-KO-Mäusen bestätigten diese außerordentliche Bedeutung der NPs als Gegenspieler des RAAS im Rahmen der Aufrechterhaltung der Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushalts sowie der Modulation des arteriellen Blutdrucks. So stellte sich bei Mäusen mit homozygoter Deletion im ANP-Gen bzw. NPR-A-Gen ein im Vergleich zu Wildtypmäusen um 20-40 mmHg höherer Blutdruck bei zugleich erhöhtem Plasmavolumen ein [254-256, 264], während umgekehrt Mäuse mit einer Überexpression von ANP oder BNP einen um 20-30 mmHg niedrigeren Blutdruck als normal sowie eine gesteigerte Diurese und Natriurese zeigten. [257, 258, 266] Bemerkenswert ist zudem, dass sich bei BNP-KO-Mäusen im Gegensatz zur bereits beschriebenen ANP-Defizienz keine Hypertension manifestiert. [260] Diese Beobachtungen lassen letztlich auf Unterschiede in der Bedeutsamkeit von ANP und BNP für die Blutdruckregulation unter physiologischen Bedingungen schließen. BNP scheint insbesondere pathophysiologisch im Rahmen von kardialen Erkrankungen eine Rolle zu spielen, wenn es in hohen Konzentrationen im Blut vorliegt. [260, 267-269]

Das Wirkspektrum von ANP und BNP umfasst darüber hinaus auch die Kontrolle von Wachstum und Proliferation. [262, 263] Der Phänotyp von ANP-KO-Mäusen beinhaltet neben der bereits erwähnten Hypertonie eine ausgeprägte kardiale Hypertrophie und dürfte somit einen lokalen wachstumshemmenden Effekt des ANP am Herzen demonstrieren. [13,

31] Im BNP-KO-Modell weisen die Mäuse dagegen eine ventrikuläre Fibrose auf. [260] Darin spiegelt sich der in vitro festgestellte hemmende Einfluss des BNP auf die Proliferation von kardialen Fibroblasten wider. [261] Auf dem Hintergrund eines bereits beschriebenen parakrinen Wirkungsmechanismus am Herzen erscheint auch die Möglichkeit einer renalen Produktion von z.B. ANP/Urodilatin oder BNP mit lokalem Eingreifen in das Zellwachstum im Rahmen der kompensatorischen Hypertrophie durchaus realistisch.

4. Fragestellung der Arbeit

Das Phänomen der kompensatorischen renalen Hypertrophie als Folge des Verlusts von funktionellem Nierengewebe ist schon sehr lange bekannt. Dennoch konnten trotz der Fortschritte durch intensive Forschung im letzten Jahrhundert grundlegende Fragen zu den am Nierenwachstum beteiligten Mechanismen bis heute nur unzureichend beantwortet werden. So soll die vorliegende Arbeit zur weiteren Aufklärung der Prozesse, die im Rahmen der Entwicklung der renalen Hypertrophie von Bedeutung sind, beitragen.

Ausgangspunkt der angestellten Überlegungen ist dabei die sog. „workload“-Hypothese, welche die glomeruläre Hyperfiltration, also den Anstieg der GFR, infolge des Untergangs funktionstüchtiger Nephrone als initialen Mediator für das Wachstum der proximalen Tubuli postuliert. Das eigentliche Ziel lag dabei in der genaueren Charakterisierung der die flussinduzierte Hypertrophie auslösenden Mechanismen bzw. in der Identifizierung des hypertrophieauslösenden Faktors, der möglicherweise von den proximalen Tubuluszellen selbst als Reaktion auf die erhöhte tubuläre Belastung sezerniert wird. Basierend auf den unter 3.1 dargelegten Vorbefunden, der allgemein bekannten renalen ANP-/Urodilatin-Produktion sowie Hinweisen auf die Beteiligung eines lokalen Faktors [49] wurde nun die Hypothese aufgestellt, dass eine lokale Produktion von ANP bzw. Urodilatin infolge des gesteigerten tubulären Flusses mitverantwortlich für die induzierte Hypertrophie ist.

Zur Überprüfung dieser Annahme sollte ein Zellmodell primärer proximaler Tubuluszellen der Maus etabliert und charakterisiert werden, indem die flussabhängige Expression verschiedener Gene, die bekanntermaßen bei der kompensatorischen Hypertrophie in vivo eine Rolle spielen, bestimmt wurde. Als Voraussetzung für die sich anschließenden Versuche musste allerdings zunächst die Gültigkeit der „workload“-Hypothese im verwendeten Modell nachgewiesen werden. Dabei wurde die tubuläre Mehrbelastung mit Hilfe eines in vitro-Flusssystems imitiert, bei dem die primären proximalen Tubuluszellen einer Superfusion mit

entsprechender Flussrate unterzogen wurden. Abb. 1.10 stellt das verwendete in vitro-Modell im Vergleich zur Situation, wie sie in vivo zu beobachten ist, dar.

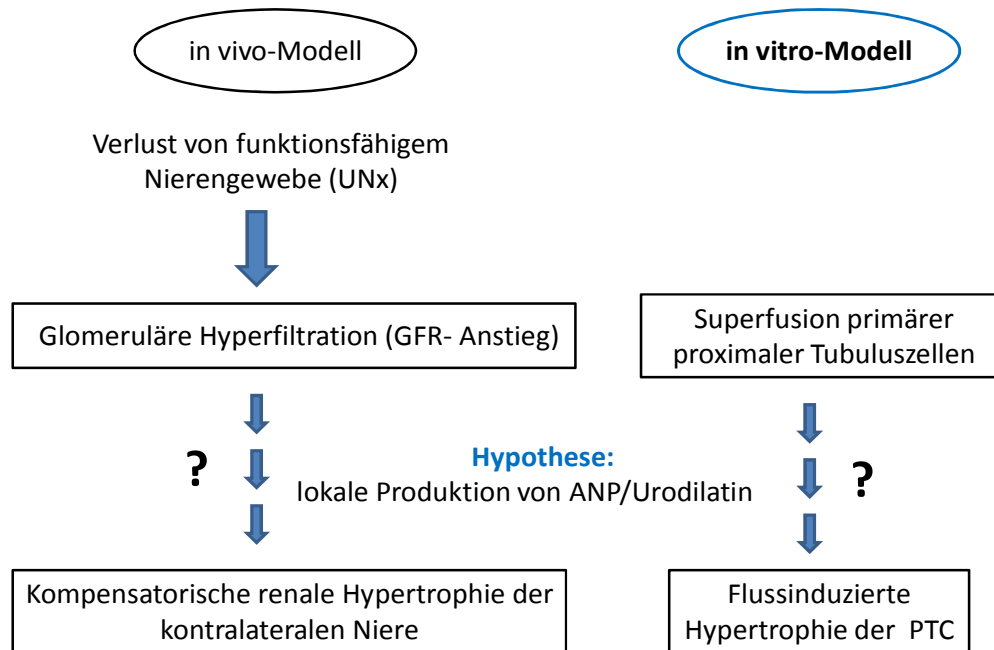


Abb. 1.10: Gegenüberstellung in vivo-Situation – in vitro-Modell

Im Hinblick auf die formulierte Hypothese einer auto- bzw. parakrinen Wirkung der NPs galt es zudem vorab zu klären, ob proximale Tubuluszellen überhaupt durch natriuretische Peptide stimulierbar sind. Es stellte sich also die Frage bezüglich der grundsätzlichen Möglichkeit einer direkten wachstumsfördernden Wirkung der NPs selbst. Um festzustellen, inwiefern lokal gebildetes ANP bzw. Urodilatin im Rahmen der flussinduzierten Hypertrophie eine Rolle spielt, kamen zusätzlich aus ANP-KO-Mäusen isolierte primäre proximale Tubuluszellen zum Einsatz. Dazu stellte ich Untersuchungen auf drei Ebenen an: Morphologische Beurteilung des Zellwachstums mittels Protein- und DNA-Bestimmung im Rahmen von Superfusions- und Stimulationsversuchen, Expressionsanalysen anhand isolierter mRNA abhängig von der Perfusion sowie direkte Konzentrationsmessungen im Perfusat. Schließlich sollte überprüft werden, ob auch lokal gebildetes BNP als weiterer Ligand der Guanylatcyclase-A für die Entwicklung der Tubulushypertrophie bei verstärkter tubulärer Beladung in Frage kommen und den ANP-Verlust zum Teil ausgleichen könnte.

Die ausschließliche Anwendung von in vitro-Studien ermöglichte eine sehr gezielte Betrachtung der ablaufenden Prozesse in einem spezifischen Nephronsegment unter kontrollierten Bedingungen und Ausschluss systemischer Einflüsse. Schwerpunktmäßig arbeitete ich hierbei mit primären proximalen Tubuluszellen, da die Primärkultur im Vergleich zu Zelllinien als das der Ursprungszelle vergleichbarere in vitro-Modell anzusehen ist. Grundlegende Mechanismen wurden dennoch zusätzlich auch an LLC-PK₁-Zellen bestätigt, um ihre Allgemeingültigkeit und Unabhängigkeit vom Zellmodell nachzuweisen.

II. Methoden

1. Zellbiologische Methoden (Zellkultur)

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten basieren auf in vitro-Untersuchungen im Sinne der Zellkultur. Unabdingbare Voraussetzung für ein erfolgreiches Zellwachstum ist dabei das Arbeiten unter sterilen Bedingungen und damit Verhindern einer Kontamination. Diesem Anspruch wurde durch Verwendung einer sterilen Werkbank, Sterilfiltrieren selbst hergestellter Lösungen, Autoklavieren von Gebrauchsgegenständen, Benutzung steriler Verbrauchsmaterialien sowie Einsatz von Antibiotika und Oberflächendesinfektion mittels 70%igem Ethanol Rechnung getragen. Außerdem wurden alle Medien und Lösungen vor Gebrauch im Wasserbad auf 37° C angewärmt.

1.1 Kultivierung und Passagieren von LLC-PK₁-Zellen

Für einen Teil der Experimente wurden LLC-PK₁-Zellen, eine Schweinenierenepithelzelllinie, verwendet. Diese proximalen Tubuluszellen wuchsen in 75 cm² großen Zellkulturflaschen mit Filter als Monolayer mit ausgeprägter Dombildung. Die Kultivierung erfolgte dabei in einem Brutschrank mit hoher Luftfeuchtigkeit bei einer konstanten Temperatur von 37° C und 5 % CO₂-Begasung mit DMEM zuzüglich 10 % FCS und 1 % Pen/Strep (genaue Zusammensetzung siehe IX., 3.). Um ein optimales Wachstum der Zellen zu gewährleisten, musste alle 48-72 Stunden ein Mediumwechsel vorgenommen werden, indem unmittelbar nach Abpipettieren des verbrauchten Mediums pro Kulturflasche 12 ml frisches, vorgewärmtes Kulturmedium (10 % FCS) hinzugegeben wurde.

Bei Erreichen der Konfluenz etwa drei bis sechs Tage nach dem Einsäen wurde mit dem Ziel der Subkultivierung bzw. des Passagierens zunächst das Nährmedium abgesaugt und der Zellrasen mit 10 ml warmer 1x PBS-Pufferlösung (steril) gewaschen, um Serumreste und divalente Kationen (Mg²⁺, Ca²⁺) zu entfernen. Anschließend wurde die Kultur mit 3,5 ml vorgewärmter Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 %) überschichtet und für 10-15 min im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Durch Verwendung eines auf eine niedrige Stufe eingestellten Schüttlers konnte der Ablösevorgang der Zellen unterstützt werden. Sobald sich die Zellen bei Betrachtung im Umkehrmikroskop von der Unterlage abhoben und abgerundet in der Lösung schwammen, wurde das Trypsin durch Zugabe von 9 ml serumhaltigen Mediums inaktiviert und damit die enzymatische Reaktion gestoppt. Nach kurzem Auf- und

Abpipettieren wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Falkontube überführt und 5 min bei 2.200 rpm und 4° C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde nach Verwerfen des Überstands in 10 ml Kulturmedium (10 % FCS) resuspendiert. Abhängig vom Bedarf an Zellen wurden je 2 bis 5 ml dieser Zellsuspension auf fünf bzw. zwei neue Kulturgefäße verteilt, die im Vorfeld bereits mit je 10 ml bzw. 7 ml serumhaltigem Medium befüllt und zur CO₂-Anreicherung in den Brutschrank gestellt wurden. Alternativ wurde nur ein Teil der Zellsuspension (2 ml) weiter kultiviert und der Rest nach entsprechender Verdünnung für die Versuchsdurchführung verwendet.

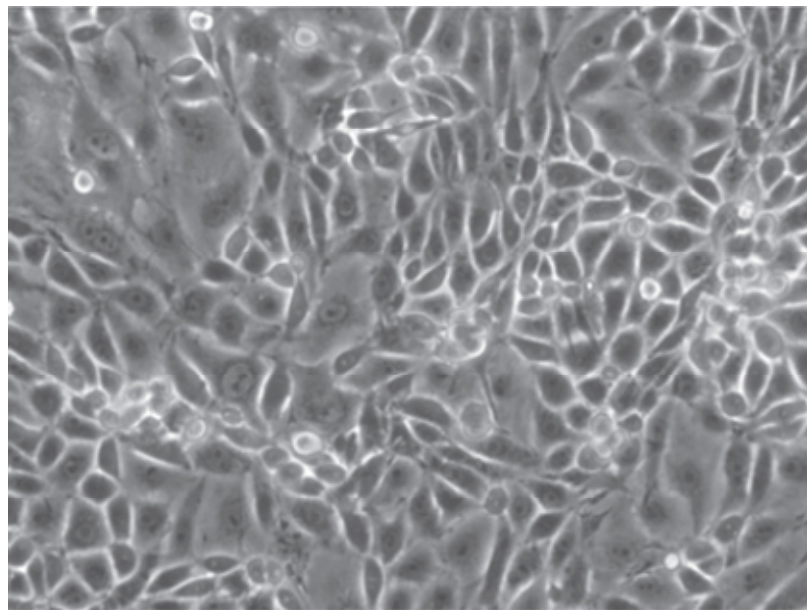


Abb. 2.1: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme zeigt morphologisches Erscheinungsmuster von konfluenten LLC-PK₁-Zellen (Vergrößerung 100x) (aus [39])

1.2 Einfrieren und Auftauen von LLC-PK₁-Zellen

Für die Anlage von Dauerkulturen wurden die adhärenenten LLC-PK₁-Zellen nach maximaler Vermehrung wie beim eben beschriebenen Splitten mittels Trypsinierung von der Unterlage gelöst, mit 9 ml serumhaltigem Kulturmedium versetzt und 5 min bei 2.200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann nach Abnehmen des Überstands in 3 ml Einfriermedium aufgenommen und gevortext. Dieses Einfriermedium enthielt neben dem Kulturmedium (DMEM + 10 % FCS + 1 % Pen/Strep) als Frostschutzmittel 8 % DMSO (steril). Die sich in Suspension befindenden Zellen konnten nun in 1 ml Portionen auf 3 spezielle Kryoröhrchen verteilt werden, wobei durch Lagerung der Tubes in einer Kryobox ein kontrolliertes,

langsames Abkühlen (-1°C/min) auf -80°C gewährleistet war. Anschließend erfolgte die Langzeitaufbewahrung in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen der LLC-PK₁-Zellen wurde das entsprechende Kryotube aus dem Stickstofflagerbehälter entnommen und sofort im Brutschrank bei 37°C inkubiert bis sich gerade eben das gesamte Medium verflüssigt hatte. In der Zwischenzeit konnte eine neue Zellkulturflasche vorbereitet und 11 ml frisches, vorgewärmtes Kulturmedium (10 % FCS) vorgelegt werden. Die möglichst rasch aufgetaute Zellsuspension (1 ml) wurde anschließend in das bereit gestellte Kulturgefäß überführt. Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten und auf der Unterlage angewachsen waren, konnte nach max. 24 h das Medium ausgetauscht werden, um das Kryoschutzmittel zu entfernen.

1.3 Isolation und Kultivierung von proximalen Tubuluszellen aus der Maus

Dem überwiegenden Anteil meiner Experimente liegen Untersuchungen an primären proximalen Tubuluszellen von Mäusenieren zugrunde, da sie verglichen mit etablierten Nierenzelllinien mehr Ähnlichkeiten bzw. Parallelen mit proximalen Tubuluszellen in vivo aufweisen. Dabei musste für jeden Versuchsansatz gesondert eine Primärzellkultur durch Isolation proximaler Tubuli direkt aus Mäusenieren angelegt werden. Für die Isolierung wurden jeweils zwei Mäuse idealerweise im Alter von 3 bis 4 Monaten herangezogen. Nachdem die Mäuse mit CO_2 narkotisiert und durch Genickbruch getötet worden waren, wurde die gesamte Ventralseite des Tieres mit 70%igem Ethanol desinfiziert und die Abdominalhöhle in Form einer medianen Laparotomie eröffnet. Durch Verlagerung der intraperitonealen Baueingeweide zur Seite und vorsichtige Präparation konnte der Retroperitonealraum dargestellt und der Abgang der Arteria renalis aus der Aorta abdominalis freigelegt werden. Sobald die Niere mobilisiert und mit einer sterilen Pinzette gefasst worden war, wurde die Arteria renalis sowie begleitende Strukturen durchtrennt. Ebenso wurde auf der Gegenseite verfahren. Die in der beschriebenen Weise entnommenen Nieren wurden zunächst in eine auf Eis gestellte Petrischale (steril), in der etwas kaltes DMEM/F12 vorgelegt war, überführt und abgedeckt. Alle weiteren Schritte erfolgten dann unter der Sterilbank. Zunächst wurde die Nierenkapsel entfernt und die Nieren in frisches, kaltes DMEM/F12 gegeben, um restliches Blut abzuwaschen. Da die proximalen Tubuluszellen mehr als 80 % der Nierenrinde bilden, wurde im Laufe der Isolation das Kortexgewebe mit Hilfe einer Skalpellschneide von der Medulla abgetrennt und in einer Glaspetrischale weiterhin auf Eis in frischem DMEM/F12 zerkleinert. Die so erhaltenen Nierenkortexstückchen wurden

anschließend mit 10 ml (2,5 ml pro Niere) bereits vor der Nierenentnahme vorbereiteter, steril filtrierter und auf 37° C vorgewärmter Verdaulösung in eine sterile, angewärmte 50 ml Schottflasche überführt und für ca. (15-)20 min bei 37° C unter leichtem Rühren aufgeschlossen (genaue Zusammensetzung der Verdaulösung siehe IX.). Um die enzymatische Reaktion durch Inaktivierung der Kollagenase zu stoppen, musste nun das Schottgefäß sofort auf Eis gestellt werden. Nachfolgend wurde die Suspension mit dem verdauten Kortextgewebe durch ein 150 µm Nylon-Sieb in zwei 50 ml Falkontubes gefiltert, mit Hilfe des Kolbens einer Spritze die übrigen Gewebestückchen bei gleichzeitigem Spülen mit 1x PBS durch den Filter gepresst und die Falkons mit kaltem 1x PBS (4° C) jeweils auf 50 ml aufgefüllt. Es schloss sich eine Zentrifugation des Filtrats für 3 min bei 600 rcf (g) und 4° C an. Nach Abpipettieren des Überstands erfolgte die Resuspension der beiden Pellets in zunächst jeweils 25 ml kalter Percoll-Lösung (4° C), die sich aus 45 % Percoll und 55 % 2x PBS + 5 mM D-Glc zusammensetzte (genaue Zusammensetzung der Percoll-Lösung siehe IX.). In 4 autoklavierte 50 ml Sorvall-Zentrifugenröhrchen wurden dann auf Eis jeweils 12,5 ml der Percoll-Suspension pipettiert. Um bei der Zellpräparation unnötige Verluste in der Ausbeute zu vermeiden, spülte man in einem zweiten Schritt mit jeweils 25 ml kalter Percoll-Lösung pro Falcon nach und überführte nach kurzem Vortexen wiederum je 12,5 ml der Suspension in die 4 Sorvall-Zentrifugenröhrchen, sodass gleich hohe Flüssigkeitsspiegel resultierten (pro Röhrchen 25 ml). Mit dem Ziel der Separierung proximaler Tubuli von Glomeruli, distalen Tubuli und anderen Gewebetrümmern wurden die vorbereiteten Sorvall-Zentrifugenröhrchen für 30 min bei 17.500 rpm und 4° C zentrifugiert, wobei sich ein Percoll-Dichtegradient ausbildete. Entsprechend ihrer Dichte sedimentierten die einzelnen Bestandteile der Suspension unterschiedlich stark, sodass 4 verschiedene Banden (F1-4) entstanden. [29] Anhand von Abb. 2.2 kann die Fraktionierung der verschiedenen Komponenten der Gewebesuspension im Percollgradienten nachvollzogen werden. Das angefertigte Foto zeigt einen Percollgradienten wie er sich unmittelbar nach der Zentrifugation darstellte. Zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Phasen wurde ihm eine Schemazeichnung gegenübergestellt. In der untersten Bande (F4), direkt über der Erythrocyten-Schicht lokalisiert, reicherten sich die proximalen Tubulusfragmente an. Dagegen wären die Glomeruli und distalen Tubuli vor allem in den Fraktionen F1 bzw. F2 zu finden, welche in der Abbildung nicht exakt voneinander abgrenzbar sind. Die Bande F3 ist normalerweise schmal und variiert in ihrer Lage zwischen F2 und F4; sie kann hier allerdings nicht eindeutig differenziert werden. Im Allgemeinen sind sowohl proximale als auch distale

Nephronsegmente mit einer Dominanz der proximalen Abschnitte in der besagten Phase F3 zu erwarten.

Percollgradient zur Isolation proximaler
Tubuli aus Mäusenieren

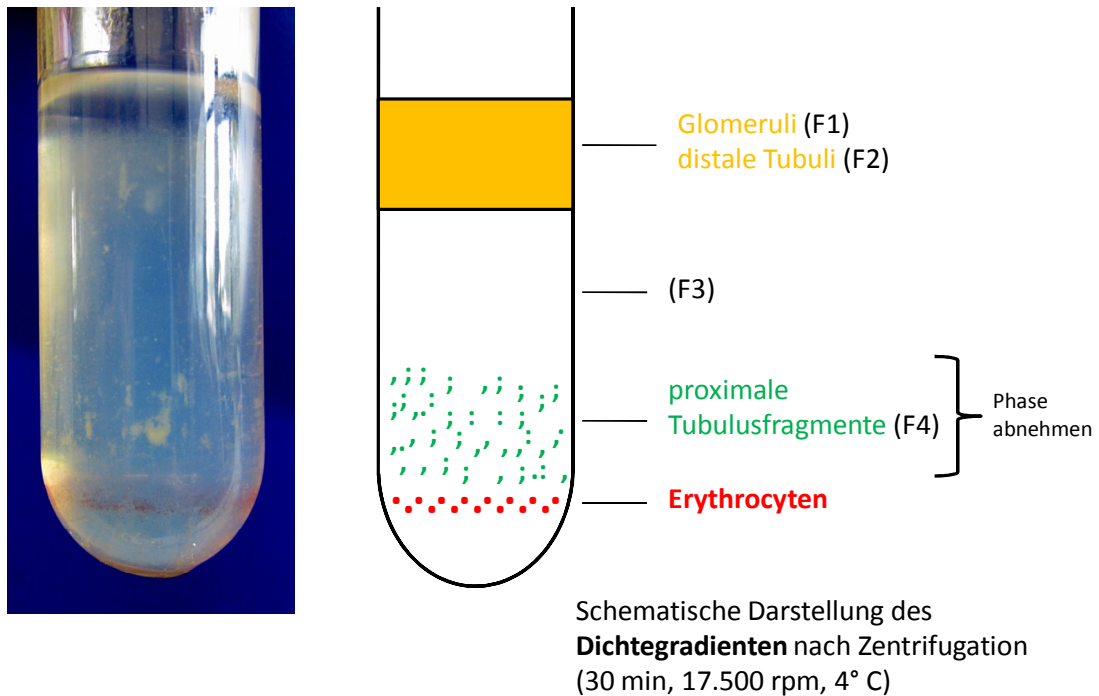


Abb. 2.2:

Auftrennung der verschiedenen Zelltypen im Percollgradienten entsprechend ihrer Dichte

links: Aufnahme des Percollgradienten in einem Sorvall-Zentrifugen-Röhrchen unmittelbar nach Zentrifugation

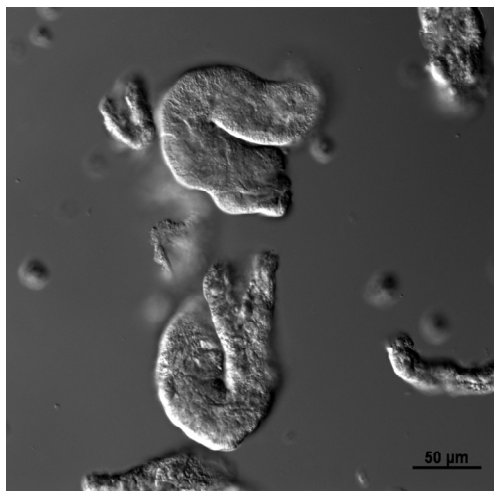
rechts: Schemazeichnung des Percollgradienten analog zum Foto

Im verwendeten Protokoll zur Isolierung proximaler Tubuli stand die Fraktion F4 im Mittelpunkt des Interesses, da sie aus einer nahezu reinen Präparation von dicken proximalen Tubulusfragmenten bestand. Zunächst wurden pro Zentrifugenröhrchen etwa 10 ml unter kreisenden Bewegungen vorsichtig abpipettiert und verworfen, um anschließend die unterste Phase über den Erythrocyten mit einer Pipette sauber abnehmen und in zwei 50 ml Falkontubes auf Eis überführen zu können. Die Tubuli wurden nun dreimal mit gekühltem 1x PBS (steril) gewaschen und bei 1.000 g und 4° C jeweils für 4 min zentrifugiert. Schließlich wurden die beiden Pellets je nach Ausbeute in insgesamt 4-6 ml Kulturmedium (DMEM/F12, 1 % FCS, 1 % Pen/Strep, Hormonzusatz) (genaue Zusammensetzung siehe IX., 3.) resuspendiert und jeweils nur 1 ml der Zellsuspension auf Zellkulturschälchen (4-6 Stück) mit einem Durchmesser von 35 mm verteilt, um ein Absetzen und Anwachsen der isolierten

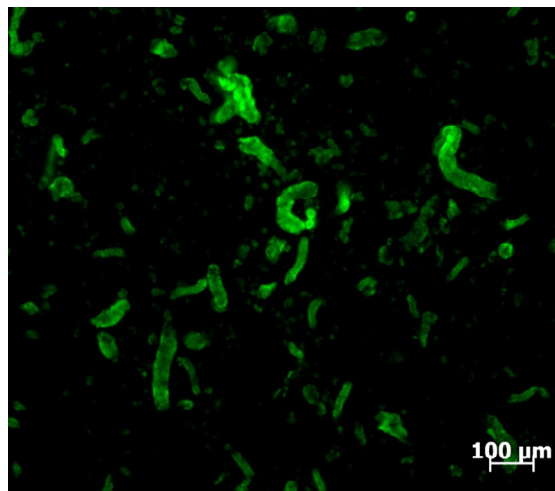
proximalen Tubuli zu gewährleisten. Eine mögliche Verunreinigung der Kultur durch Fibroblasten sollte verhindert werden, indem bereits nach 12-20 h erstmals das Medium erneuert wurde. Dabei wurde das Medium vorsichtig vom Rand der Schale her abgesaugt und die Tubuli sofort mit 1,5 ml des vorgewärmten frischen Nährmediums überschichtet. Alle weiteren Mediumwechsel sowie die mikroskopische Untersuchung auf Kontaminationen fanden im Abstand von 24-48 h statt. Die Kultivierung erfolgte in einem humidifizierten Inkubator bei einer konstanten Temperatur von 37° C und 5 % CO₂-Atmosphäre. Nach 5 bis max. 6 Tagen war die nötige Konfluenz der aus den isolierten Tubuli ausgewachsenen primären proximalen Tubuluszellen erreicht, sodass sie für ein Experiment ausgesät werden konnten.

Abb. 2.3 zeigt zum einen Aufnahmen von proximalen Tubuli in Suspension direkt nach Isolation und Überführen in die Zellkulturschälchen; noch sind die Tubuli nicht angewachsen. Zum anderen wurde der nach 5 Tagen von den adhärennten primären proximalen Tubuluszellen nach Auswachsen aus den Tubuli gebildete Monolayer fotografiert, sodass das morphologische Erscheinungsmuster konfluenter PTC erkennbar ist.

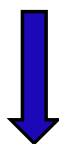
Tag 0: Frisch isolierte proximale Tubuli



Vergrößerung 20x

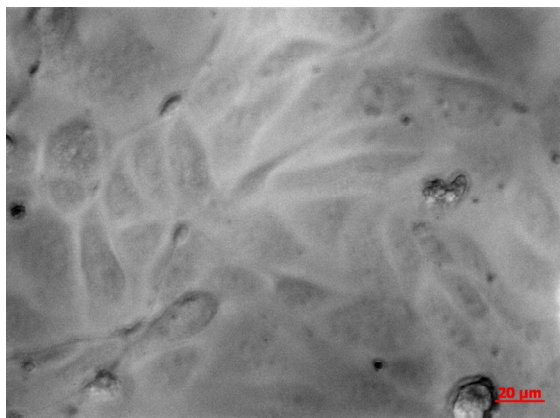


Vergrößerung 10x

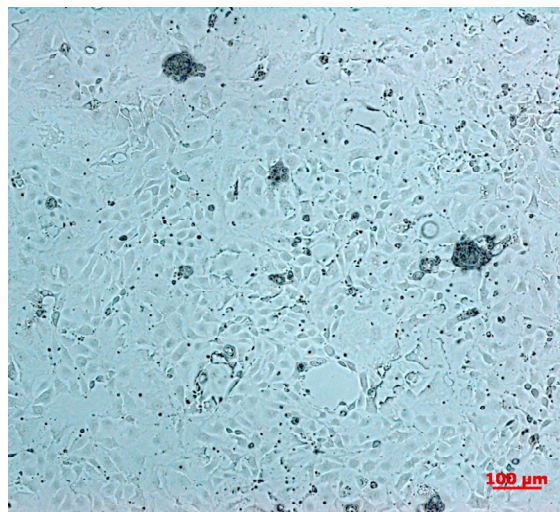


Kultivierung für **5 Tage**: 37° C, 5 % CO₂

Tag 5: Konfluenten Zellrasen (Monolayer)



Vergrößerung 40x



Vergrößerung 10x

Abb. 2.3: Aufnahmen frisch isolierter proximaler Tubuli sowie konfluenter proximaler Tubuluszellen aus der Mäuseniere

oben: Proximale Tubuli in Suspension unmittelbar nach Isolation (Tag 0)
unten: Monolayer primärer proximaler Tubuluszellen (Tag 5)
(Aufnahmen mittels Fluoreszenzmikroskop: Phasenkontrast bzw. Eigenfluoreszenz)

1.4 Zählen und Aussäen von proximalen Tubuluszellen

Sowohl bei den LLC-PK₁-Zellen als auch bei den primären proximalen Tubuluszellen konnte nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens die Aussaat der Zellen für die jeweiligen Versuche in 24 Well-Platten vorgenommen werden.

Dazu mussten die adhärenenten LLC-PK₁-Zellen zunächst von ihrer Unterlage gelöst und vereinzelt werden, indem prinzipiell wie beim unter 1.1 beschriebenen Splitten der Zellen vorgegangen wurde. Das infolge der Zentrifugation entstandene Pellet wurde dann allerdings in 10 ml serumfreiem Medium (DMEM) aufgenommen, gevortext und 2 ml der Suspension für die weitere Kultivierung abgezogen. Anschließend wurde die Zellkonzentration der für die Aussaat zu Verfügung stehenden Zellsuspension (8 ml) bestimmt und eine entsprechende Verdünnung mit Medium hergestellt, sodass die LLC-PK₁-Zellen letztlich in einer Dichte von 250.000 pro Well ausgesät werden konnten. Dabei wurden auf einer 24 Well-Platte pro Vertiefung 500 µl der Zellsuspension pipettiert und die Platte kurz geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu gewährleisten. Das Medium für die Anwachsphase enthielt nur 0,5 % FCS. Innerhalb von 24 h waren die Wells bereits wieder kontinuierlich bewachsen, sodass der eigentliche Versuch angesetzt werden konnte.

Beim Aussäen der primären proximalen Tubuluszellen wurden die 4-6 bei einer Isolation gewonnenen, kontinuierlich bewachsenen Kulturschälchen herangezogen. Nachdem das Nährmedium vorsichtig abgesaugt und der Zellrasen mit 2 ml vorgewärmtem 1x PBS (steril) pro Schälchen gewaschen worden war, wurde jede Petrischale mit 850 µl angewärmter Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 %) versetzt und für 5-10 min bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde durch intermittierendes leichtes Beklopfen des Zellkulturgefäßes unterstützt. Mittels einer Pipette wurden die noch lose anhaftenden Zellen abgespült, durch Auf- und Abpipettieren gut suspendiert und in ein 50 ml Falkontube überführt, in dem 2 ml warmes serumhaltiges DMEM/F12 (1 % FCS) vorgelegt waren. Jedes Schälchen wurde außerdem noch zweimal mit je 1 ml Kulturmedium (1 % FCS) nachgespült. Es schloss sich nun eine Zentrifugation der gesammelten Zellsuspension bei 2.200 rpm und 4° C für 5 min an. Nach Verwerfen des Überstands nahm man das Pellet in 37° C warmem Kulturmedium (1 % FCS) auf und bestimmte nach sorgfältiger Durchmischung der Suspension die Zellkonzentration. Die Verdünnung wurde so berechnet und hergestellt, dass

die Zellsuspension letztlich 150.000 Zellen pro 500 µl enthielt. Pro Well einer 24 Well-Platte konnten somit 150.000 Zellen in serum- und hormonhaltigem DMEM/F12 (1 % FCS) eingesät werden. Vorsichtiges Schwenken der Well-Platte sollte eine gute Durchmischung und gleichmäßiges Anwachsen der Zellen begünstigen. Bereits am folgenden Tag wurde nach Erreichen der Konfluenz mit dem vorgesehenen Experiment begonnen.

Die Zellzählung zur Bestimmung der Zellkonzentration wurde routinemäßig vor jeder Einsaat mit Hilfe der Neubauer improved-Zählkammer (Tiefe 0,1 mm) vorgenommen. Nachdem das leicht angefeuchtete Deckglas über die Seitenstege der Zählkammer gelegt worden war, wurden unter Gebrauch einer Pipette 25 µl der gut durchmischten Zellsuspension in die Kammer gefüllt. Im Mittelquadrat (Fläche 1 mm²) wurden jeweils die 5 diagonal gelegenen Felder ausgezählt, der Mittelwert daraus gebildet und das Ergebnis mit 50 multipliziert. So ergab sich die Zellzahl pro µl Zellsuspension.

2. Stimulation von proximalen Tubuluszellen

Die Stimationsversuche wurden an primären proximalen Tubuluszellen der Maus durchgeführt. Die am Vortag in 24 Well-Platten ausgesäten und unter Standardbedingungen (37° C, 5 % CO₂) kultivierten Zellen konnten über Nacht adhären und durch Teilung einen konfluenten Zellrasen bilden. Zunächst wurde das serumhaltige Kulturmedium unter Verwendung einer Pumpe aus den einzelnen Vertiefungen abgesaugt und in jedes Well 1 ml des vorgewärmten 1x PBS (steril) pipettiert. Nach leichtem Schwenken der Platte konnte der PBS-Puffer wieder abgesaugt und pro Well 500 µl des jeweiligen Stimulationsansatzes auf die Zellen gegeben werden. Man ließ die Zellen dann mit den Testsubstanzen im Brutschrank für 24 h inkubieren. Grundsätzlich wurde für alle Stimationsversuche serum- und hormonfreies Medium verwendet. Demzufolge wurden die stets mitgeführten sogenannten Kontrollzellen für 24 h in 500 µl DMEM/F12 mit 1 % Pen/Strep inkubiert. Die Stimulationsansätze enthielten zusätzlich jeweils eine bestimmte Substanz, deren Wirkung untersucht werden sollte, in definierter Konzentration. In 50 ml Falkontubes wurden die verschiedenen Ansätze bereits kurz vor dem Waschen der Zellen in PBS vorbereitet und vorübergehend ins Wasserbad gestellt. Nach der festgelegten Stimulationsdauer von 24 h folgte das Ernten der Zellen.

Bei der Stimulation der PTC (Wt bzw. ANP-KO) kamen dabei folgende Reagenzien zum Einsatz: ANP (1 nM, 10 nM, 100 nM), BNP (1 nM, 10 nM, 100 nM) sowie TGFβ (100 pM).

3. Superfusion von proximalen Tubuluszellen

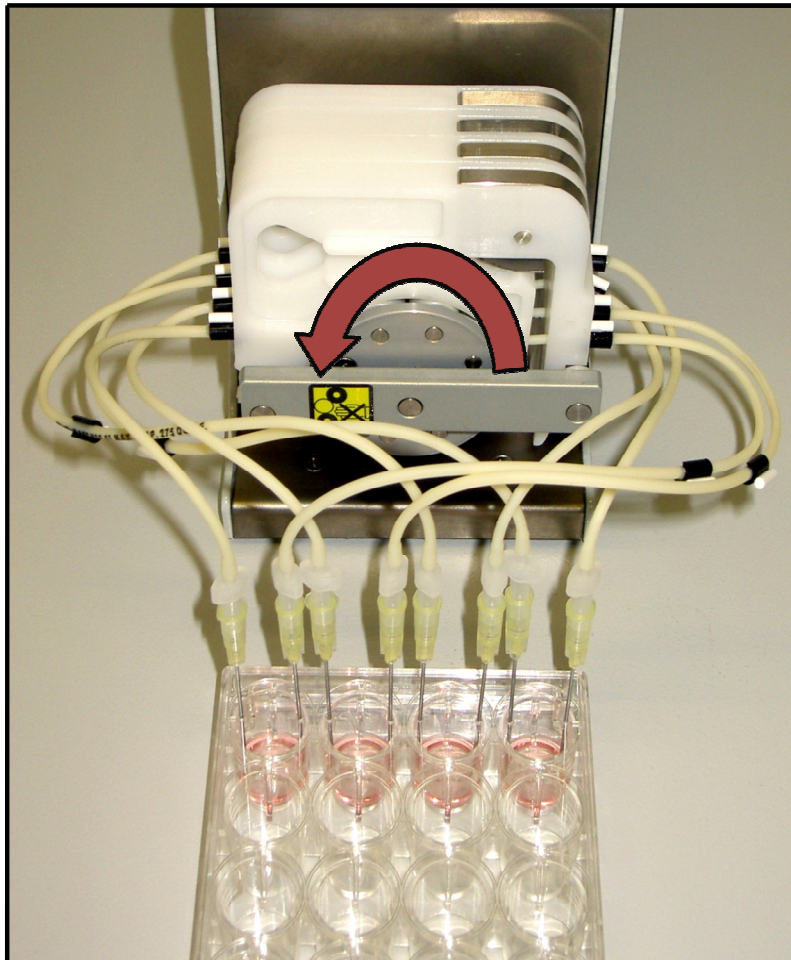
Entsprechend der vorgegebenen Fragestellung spielt das im Folgenden dargestellte in vitro-Flussmodell zur Superfusion von proximalen Tubuluszellen im Rahmen meiner Arbeit eine ganz zentrale Rolle. Erst dadurch ist es überhaupt möglich den Einfluss eines erhöhten tubulären Flusses auf das renale Zellwachstum im Sinne der „workload“-Hypothese und die dabei zugrunde liegenden Mechanismen in Kultur genauer zu untersuchen.

3.1 In vitro-Flussmodell - Versuchsaufbau und Funktionsprinzip

Das verwendete in vitro-Flusssystem ermöglichte die Superfusion von proximalen Tubuluszellen, die in 24 Well-Platten ausgesät und bis zur Konfluenz unter Standardbedingungen kultiviert worden waren. Ziel war es dabei eine vermehrte tubuläre Beladung zu imitieren. Zur Erzeugung eines Flüssigkeitsstroms diente eine REGLO Analog Schlauchpumpe von ISMATEC (Wertheim). Wie in der Darstellung des Versuchsaufbaus (Abb. 2.4) zu erkennen ist, wurde ein Modell mit 4 Kanälen und 8 Rollen verwendet. Dadurch war es möglich mit einer Pumpe gleichzeitig die Zellen von 4 Wells zu superfundieren, d.h. mit Medium zu überspülen. Das Medium fließt aufgrund des aufgebauten Sogs zunächst durch die eine Kanüle und ein gerades Schlauchverbindungsstück in den Schlauch (Innendurchmesser 0,89 mm) und schließlich über das zweite Verbindungsstück durch die zweite Kanüle wieder zurück ins Well. Durch diesen von der Pumpe angetriebenen Transfer des Mediums vom einen Rand der Vertiefung über den Schlauch zum gegenüberliegenden Rand der Vertiefung kann eine Zirkulation innerhalb des Wells erreicht werden, sodass die mechanische Belastung der proximalen Tubuluszellen bei tubulärer Mehrbeladung in vivo anhand des Modells nachgeahmt werden kann. In Abb. 2.5 wird eben diese Zirkulation des Mediums schematisch am Beispiel eines einzelnen Wells verdeutlicht. Insbesondere auch die Möglichkeit der Einstellung verschiedener Flussgeschwindigkeiten ist hier von Bedeutung. Dabei ist die Perfusionsrate in Stufen von 10 bis 90 regulierbar.

Jeder der 4 Pumpenschläuche wird in eine Kassette eingelegt, die dann auf den Rollenkopf gesetzt und eingeklinkt wird. Daher kommt auch die synonyme Bezeichnung der Schlauchpumpe als Rollen- oder Peristaltikpumpe. Der Schlauch stützt sich außen am Gehäuse des Pumpenkopfes ab und wird von innen durch Rollen abgeklemmt, die sich an einem Rotor drehen. Die Rotation führt dazu, dass die Abklemmstelle entlang des Schlauchs

wandert und so das zu fördernde Medium vorangetrieben wird. Ein Vorteil dieses Systems ist die vergleichsweise stoßfreie Förderung und somit ein kontinuierlicher Fluss.



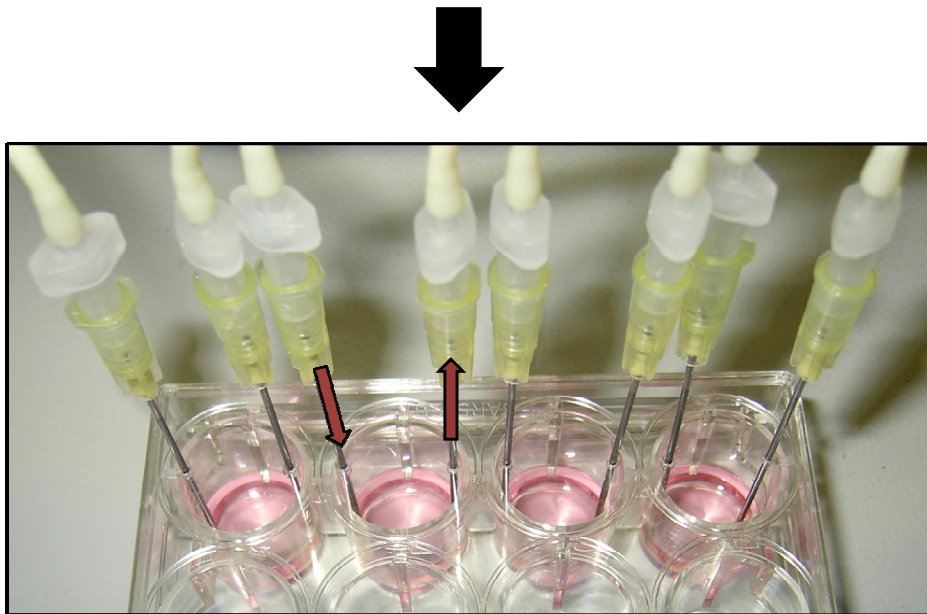


Abb. 2.4:
In vitro-Flussmodell - Versuchsaufbau zur Superfusion proximaler Tubuluszellen

Schematische Darstellung des **Superfusionsversuchs**

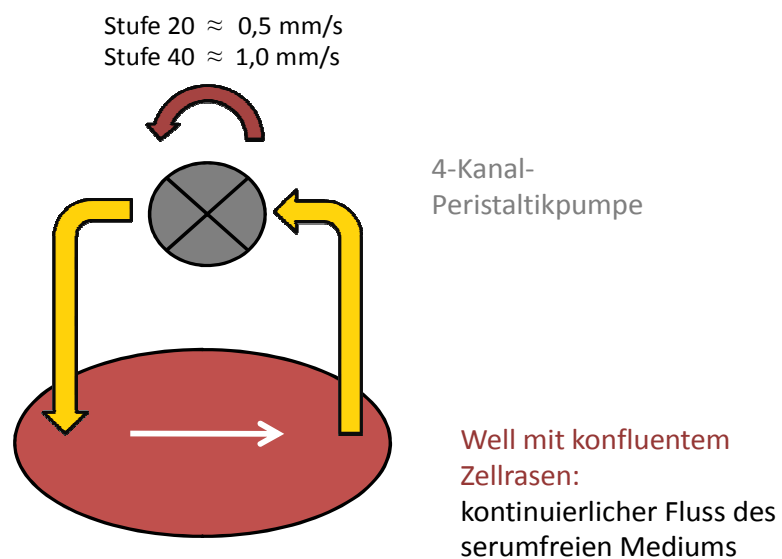


Abb. 2.5: In vitro-Flussmodell - Schemazeichnung (dargestellt für 1 Well)

3.2 Versuchsdurchführung und -bedingungen

Für die Perfusionsexperimente wurden sowohl die immortalisierte proximale Tubuluszelllinie LLC-PK₁, wenn auch in geringerem Umfang, als auch aus Mäusenieren isolierte PTC verwendet. Bei der Aussaat der Zellen, die für die Perfusion vorgesehen waren, musste beachtet werden, dass jeweils die 4 übereinander liegenden Wells an den Rändern der 24 Well-Platte benutzt wurden, um den Anschluss an die Pumpe zu ermöglichen. Parallel waren pro Versuchsansatz zwei Pumpen in Betrieb, sodass 8 Wells zur gleichen Zeit unter vergleichbaren Bedingungen perfundiert werden konnten. Im Falle der synchronen Superfusion von Wildtyp- und ANP-KO-Zellen (PTC) wurden die beiden Pumpen alternierend für beide Zelltypen eingesetzt, um mögliche geringfügige Abweichungen zwischen den beiden Pumpen als Fehlerquelle auszuschließen. Voraussetzung für die Perfusion war zunächst die Ausbildung eines konfluenten Zellrasens in den einzelnen Vertiefungen nach einer Kultivierung über 24 h bei 37° C und 5 % CO₂. Pro Pumpe mussten im Vorfeld 4 Schläuche (ISMATEC, Wertheim) vorbereitet werden: Beide Schlauchenden wurden jeweils über ein gerades Verbindungsstück mit einer 20G Einmal-Kanüle verbunden, autoklaviert und durch Lagerung im Trockenschrank von Flüssigkeitsresten befreit. Außerdem waren zwei 24 Well-Platten zu präparieren, indem man jeweils einen Rand des Deckels mit je 2 Löchern pro Well versah, durch welche dann die Kanülen eingebracht wurden und Kontakt zum Medium aufnehmen konnten (siehe Abb. 2.4). Nachdem das Flusssystem unter sterilen Bedingungen aufgebaut worden war, pipettierte man jeweils 1 ml serum- und hormonfreies Medium (DMEM bzw. DMEM/F12 + 1 % Pen/Strep) in die 4 Wells, die nachfolgend perfundiert werden sollten. Nach Anschluss an eine Stromquelle und Einstellen der gewünschten Flussrate sowie -richtung wurde das Flussmodell in den Brutschrank gestellt, um das Medium mit CO₂ anzureichern, die Schläuche zu füllen und das ganze System auf 37° C zu erwärmen. Da die Superfusion mit serumfreiem Medium vorgenommen werden sollte, musste nun das beim Aussäen verwendete Medium aus allen Wells entfernt und die Zellen mit 1 ml 37° C warmem 1x PBS (steril) gewaschen werden. Anschließend wurden in jedes Well, sowohl auf die Kontrollzellen als auch auf die zu perfundierenden Zellen, 500 µl serum- und hormonfreies Medium pipettiert. Nach Wechsel des Mediums wurden die 24 Well-Platten in den Inkubator überführt und an die Pumpen angeschlossen, indem der Deckel ausgetauscht wurde. So wurden die Zellen für 24 h bei 37° C und 5 % CO₂ mit Medium überspült bzw. statisch inkubiert (Kontrollzellen). Die Wahl der Flussgeschwindigkeit orientierte sich an Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe, in denen der maximale Effekt bei 1 mm/s festzustellen war. Bei den LLC-PK₁-Zellen stellte man daher

an den Pumpen Stufe 40 ein, was einer Perfusionsrate von 1 mm/s entspricht. In meinen Experimenten mit primären proximalen Tubuluszellen hatte sich dagegen eine Flussrate von 0,5 mm/s bewährt, sodass das Gerät auf Stufe 20 eingestellt wurde. Die angewandten Strömungsgeschwindigkeiten lagen dabei gemäß Studien der Arbeitsgruppe um Peti-Peterdi mittels der Multiphotonenmikroskopie im physiologischen Bereich. [5] Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die Schläuche vor dem Autoklavieren gründlich mit Milliporwasser gespült, um Verklebungen durch Mediumreste zu verhindern.

4. DNA- und Protein-Bestimmung aus proximalen Tubuluszellen

Um die durch die Stimulation bzw. Superfusion bedingte Wirkung auf das Wachstum der Zellen richtig einordnen und quantifizieren zu können, wurden die Zellen geerntet und anschließend sowohl der DNA- als auch der Proteingehalt der behandelten Zellen und der Kontrollzellen pro Well ermittelt. Die daraus berechnete Protein/DNA-Ratio bzw. die Veränderung des Verhältnisses verglichen mit den Kontrollzellen als Folge der Stimulation/Superfusion diente dann zur Unterscheidung einer Hypertrophie von einer Hyperplasie. Außerdem ist dieses Verhältnis als Maß für die Stärke einer induzierten Hypertrophie anzusehen.

Zunächst wurde das Medium aus den einzelnen Wells entfernt und der Zellrasen mit jeweils 1 ml 1x PBS-Puffer unter leichtem Schwenken sorgfältig gewaschen. Nach Absaugen des Puffers wurden die Zellen in 320 µl H₂O (sterilfiltriert) pro Well lysiert. Dabei wurden sie für eine Stunde bei 37° C im Brutschrank inkubiert und anschließend bei -80° C schockgefroren. Anschließend, nach etwa einer halben Stunde, ließ man die 24 Well-Platten bei Raumtemperatur langsam auftauen. Durch gründliches Auf- und Abpipettieren war gewährleistet, dass sich auch die noch am Rand des Wells haftenden Zellen lösten und ein homogenes Gemisch entstand.

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe des ‚Fluo Reporter® Blue Fluorometric dsDNA Quantitation Kits‘ (F-2962) (Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe). Dabei beruht diese Methode zur Quantifizierung der DNA auf der spezifischen Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs Hoechst 33258 an doppelsträngige DNA. Anders als im Herstellerprotokoll empfohlen wurden die Zellen in 320 µl statt 100 µl H₂O lysiert, da eine Doppelbestimmung der Proben vorgenommen werden sollte und zudem 120 µl für die nachfolgende Proteinbestimmung benötigt wurden. In einer 96 Well-Mikrotiterplatte wurden

jeweils 100 µl des Zelllysats mit 100 µl des Bestimmungsreagenz (25 µl Hoechst 33258 in 10 ml TNE-Puffer) vermischt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde eine DNA-Verdünnungsreihe in TE-Puffer von 1.000 ng/100 µl bis 0 ng/100 µl pipettiert. Die Konzentration aller Proben wurde doppelt bestimmt, um durch eine Mittelwertbildung Pipettierungenauigkeiten auszugleichen. Mittels eines Fluorometers (Luminescence Spectrometer LS 50B, PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau Jügesheim) konnte für alle Proben in einem Schritt die Fluoreszenz des DNA gebundenen Farbstoffs mit einem Absorptionsmaximum bei 360 nm und einem Emissionsmaximum bei 460 nm gemessen und die DNA-Konzentration anhand der Standardkurve berechnet werden.

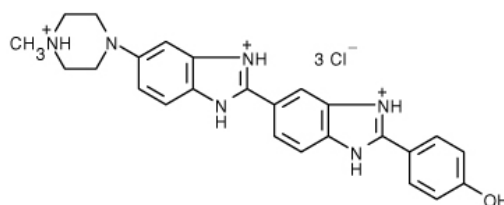


Abb. 2.6: Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffs Hoechst 33258

Für die Bestimmung des jeweils dazugehörigen Proteingehalts wurden die in den Wells verbliebenen 120 µl des Zelllysats verwendet. Man benutzte dazu das Protokoll des ‚Protein Quantification Assay‘ (Macherey-Nagel, Düren) in etwas modifizierter Form. Um alle Proteine in Lösung zu bringen, wurden zunächst 40 µl PSB (Protein Solving Buffer) unverdünnt in jedes Well pipettiert und durch Schwenken der Zellkulturplatte mit dem Lysat gut vermischt. Auch bei der Proteinbestimmung wurden für eine Mittelwertberechnung alle Proben doppelt aufgetragen. Folglich nahm man zweimal 60 µl aus jedem Well und pipettierte sie in eine 96 Well-Platte mit flachem Boden. Für die Erstellung einer Kalibriergeraden musste eine 1:4 Verdünnung des PSB mit Wasser vorbereitet werden. 1 mg BSA wurde dann in 1 ml des verdünnten PSB durch Vortexen vollständig gelöst. Davon ausgehend erhielt man durch entsprechendes Verdünnen mit PSB 1:4 eine Standardreihe bekannter Proteinkonzentrationen von 1 µg/µl bis 0 µg/µl, wobei ebenfalls jeweils 60 µl für die Messung verwendet wurden. Schließlich gab man in jedes Well noch 40 µl des Quantification Reagent (QR) hinzu und schwenkte die Platte vorsichtig. Nach ca. 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 620 nm im Mikrotiterplattenphotometer (Sunrise Absorbance Reader, TECAN, Austria; Magellan 2) photometrisch gemessen.

5. Molekularbiologische Methoden

Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Methoden ermöglichten es letztendlich Aussagen über die Expression verschiedener Gene im Zusammenhang mit der flussinduzierten Hypertrophie zu treffen. Für diese Genexpressionsanalyse wurden ausschließlich primäre proximale Tubuluszellen der Maus (C57BL/6) verwendet, die wie unter 3.2 erläutert für 24 h perfundiert worden waren.

5.1 RNA-Isolation aus primären proximalen Tubuluszellen

Beim Arbeiten mit RNA wurden grundsätzlich nur RNase-freie Substanzen, Plastik- und Glaswaren verwendet sowie Lösungen mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt.

5.1.1 Isolation der Gesamt-RNA

Die Isolation der RNA aus eukaryontischen Zellen (PTC) erfolgte mit Hilfe des TRIsure™-Reagenz (Bioline, Luckenwalde) unter leichter Abwandlung des Herstellerprotokolls. Als erstes wurde das Perfusionsmedium vollständig abgenommen und pro Well 200 µl TRIsure hinzupipettiert, um die Zellen zu lysieren und die RNA freizusetzen. Die Homogenisierung der Proben durch ausgiebiges Auf- und Abpipettieren wurde unter dem Abzug auf Eis durchgeführt. Bis zur Isolation der RNA konnten die Zelllysate nach Überführen in je ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß bei -80° C aufbewahrt werden. Nach 5-minütiger Inkubation der Proben bei Raumtemperatur wurden jeweils 40 µl Chloroform hinzugegeben und durch Schütteln (15 s) gut durchmischt. Einer wiederholten Inkubation bei Raumtemperatur für 2 min folgte nun mit dem Ziel der Phasentrennung eine Zentrifugation der Proben bei 12.000 g und 4° C für 15 min in einer Eppendorftischzentrifuge. Die obere wässrig klare Phase (ca. 100 µl), die die RNA enthält, wurde abgenommen, in neue 1,5 ml Eppendorf-Cups überführt und zur Fällung der RNA mit jeweils 100 µl 100 % Isopropanol kräftig durchmischt. Der 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur schloss sich erneut eine Zentrifugation bei 12.000 g und 4° C für 10 min an. Nachdem die Proben nun wieder auf Eis gestellt worden waren, nahm man die Überstände ab, pipettierte zum Waschen des Pellets 200 µl 75 % Ethanol in jedes Eppendorf-Cup und zentrifugierte die Proben nach kurzem Vortexen bei 7.500 g und 4° C für 5 min. Schließlich wurde das Pellet nach Verwerfen des Überstands bei Raumtemperatur ca. 5 min getrocknet, in 15 µl DEPC-H₂O resuspendiert und max. für 2 min im Heizblock bei 55° C inkubiert, um die RNA vollständig zu lösen. Die extrahierte Gesamt-

RNA wurde noch kurz auf Eis gestellt, um dann bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt zu werden.

5.1.2 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Unmittelbar vor der weiteren Verwendung der RNA im Sinne der Reversen Transkription musste die in den jeweiligen Eppendorf-Cups vorliegende RNA-Konzentration gemessen werden. Die Proben wurden demnach einmalig aufgetaut; das Auftauen erfolgte hierbei auf Eis. Zur quantitativen Bestimmung der RNA kam ein NanoDrop Spektrophotometer (ND 1000, PeqLab, Erlangen) zur Anwendung. Die Konzentration der RNA wurde dabei über die Messung der optischen Dichte (OD) bzw. der Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren, ermittelt. Dazu wurden für eine Messung 2 μl der Probe benötigt; als Leerwert wurden 2 μl DEPC- H_2O vermessen. Aus dem Verhältnis der $\text{OD}_{260\text{nm}}$ und der $\text{OD}_{280\text{nm}}$ erhielt man außerdem eine Aussage über Proteinkontaminationen in der Lösung. Eine proteinfreie Nukleinsäurelösung wies demnach ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0 auf.

5.2 Reverse Transkription der isolierten RNA (cDNA-Synthese)

Ziel war es grundsätzlich die Menge der transkribierten mRNA eines bestimmten Gens zu messen, d.h. die Expression eines Gens zu quantifizieren. Eine derartige Quantifizierung von Nukleinsäuren kann mittels der quantitativen Echtzeit-PCR (RTqPCR) realisiert werden, für die allerdings DNA als Ausgangsmaterial erforderlich ist. Daher wurde der RTqPCR eine Reverse Transkription vorgeschaltet, bei der gemäß der Bezeichnung die extrahierte RNA mit Hilfe eines Enzyms, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, in complementary DNA (cDNA) umgeschrieben wird.

Aus den photometrisch erhobenen RNA-Konzentrationen wurde für jede Probe zunächst das für die Reverse Transkription benötigte Volumen berechnet, sodass 1 μg total RNA eingesetzt werden konnte. Das jeweils ermittelte Volumen wurde dann auf Eis in 200 μl Eppendorfreaktionsgefäßen mit RNase-freiem Wasser (DEPC-behandelt) auf 10 μl aufgefüllt und je 1 μl Oligo(dT)₁₅ Primer [0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$] hinzupipettiert. Die Wahl eines Oligo(dT) Primers aus 15 Thymidinen ermöglichte eine selektive Umschreibung der isolierten mRNA, indem er an den Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende eukaryontischer mRNA bindet. Nach kurzem Abzentrifugieren erhitzte man die Ansätze für 5 min auf 65°C , um die Sekundärstrukturen

der RNA aufzuschmelzen, und stellte sie anschließend sofort wieder auf Eis. Während der Hybridisierung der Primer wurde ein Mastermix aus folgenden Komponenten vorbereitet:

je 4 µl	5x First Strand Buffer	}	insgesamt 9 µl pro Reaktionsansatz
je 4 µl	dNTPs (2,5 mM)		
je 1 µl	M-MLV-RT (200 U/µl)		

Schließlich pipettierte man in jedes Reaktionsgefäß 9 µl dieser Mischung hinzu, zentrifugierte die 20 µl Ansätze kurz und stellte sie zur Inkubation für 1 h bei 37° C, dem Arbeitsoptimum der verwendeten Reversen Transkriptase aus dem Moloney murine leukemia virus (M-MLV-RT), in den Thermocycler (Labcycler, SENSOQUEST, Göttingen). Durch Erhitzen des Heizblocks für 2 min auf 94° C wurde die Reaktion infolge der Denaturierung der RT zum Stillstand gebracht. Die erhaltene cDNA wurde durch Zugabe von 20 µl Wasser im Verhältnis 1:2 verdünnt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20° C gelagert.

Gleichzeitig wurde bei der Reversen Transkription im Hinblick auf die sich anschließende RTqPCR auch immer für eine Probe eine Negativkontrolle mitgeführt. Dabei wurde prinzipiell genauso verfahren wie oben beschrieben mit dem Unterschied, dass die M-MLV-RT durch 1 µl DEPC-H₂O ersetzt wurde. Demzufolge dürfte in diesem sog. -RT-Ansatz keine cDNA als Template für die folgende RTqPCR synthetisiert worden sein.

5.3 Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (RTqPCR)

5.3.1 Prinzip der RTqPCR

Zur Messung der mRNA-Menge bzw. der durch Reverse Transkription erhaltenen cDNA als Maß für die transkribierte mRNA wurde eine real-time PCR, die modernste Methode der Quantifizierung von Nukleinsäuren, mit Hilfe des LightCycler® 480 Real-Time PCR Systems (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Dieses Verfahren macht sich die Kinetik der PCR-Reaktion zunutze. In den frühen PCR-Runden findet hierbei eine weitgehend exponentielle Vermehrung eines bestimmten DNA-Fragments statt, das durch die Sequenz des für die Amplifikation benutzten Primerpaares bestimmt wird. Je nach Ausgangsmenge der entsprechenden Template-cDNA in der untersuchten Probe wird die Detektionsgrenze durch das entstehende PCR-Produkt in einem früheren oder späteren PCR-Zyklus überschritten. Dabei basiert die Erfassung der Menge des PCR-Produkts auf der Messung des

Fluoreszenzanstiegs, sobald der beigemischte Farbstoff, in meinen Experimenten SYBR® Green I, unspezifisch in doppelsträngige DNA eingebaut wurde. Die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrund abhebt, wird als crossing point (Cp) angegeben. Durch parallele Amplifikation bekannter Templatemengen und Ermittlung der zugehörigen crossing points kann eine Standardkurve erstellt werden, die es erlaubt aus den Cps der Proben auf die jeweils ursprünglich vorhandene DNA-Menge zu schließen. Kurzum kombiniert also die quantitative Echtzeit-PCR die PCR-Methode mit der Fluoreszenz-Detektion zur Quantifizierung der bei jedem Zyklus entstehenden PCR-Produkte.

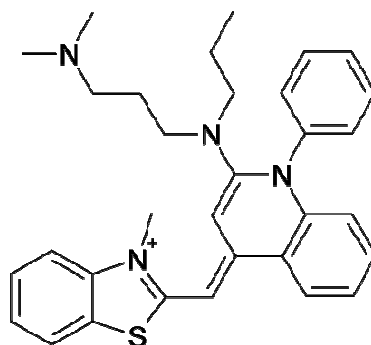


Abb. 2.7: Strukturformel des DNA-interkalierenden Farbstoffs SYBR® Green I

5.3.2 Durchführung und Auswertung der RTqPCR

Die RTqPCR erfolgte unter Verwendung des Light Cycler 480 SYBR® Green I Master Kits (Roche Diagnostics, Mannheim) in 10 µl Ansätzen auf einer speziellen 96 Well-Lightcycler-Platte. Als erstes wurde dazu auf Eis ein Mastermix pipettiert, der sich aus folgenden Bestandteilen zusammensetzte:

je 5,0 µl SYBR® Green I

je 3,0 µl H₂O

je 0,5 µl forward Primer (10 pmol/µl)

je 0,5 µl reverse Primer (10 pmol/µl)

insgesamt 9 µl pro Reaktionsansatz

Zu 9 µl Mastermix wurde 1 µl der umgeschriebenen cDNA-Probe in je ein Well der Lightcycler-Platte gegeben. Für die beiden Negativkontrollen nahm man anstelle der Probe zum einen 1 µl des -RT-Ansatzes, also der bei der Reversen Transkription eingesetzten Kontrollprobe, und zum anderen 1 µl H₂O. Um eine Standardkurve zu generieren, die auf einem Pool aus allen cDNA-Proben der Kontrollzellen basierte, setzte man die gepoolte

cDNA in Konzentrationsverhältnissen von 1, 1:3, 1:6 und 1:9 ein. Der relative Gehalt an genspezifischer mRNA in den Proben konnte somit durch Vergleich ihres Cps mit der Standardkurve ermittelt werden. Für die Standardreihe wurde dabei zum Ausgleich von Pipettierungenauigkeiten stets eine Doppelbestimmung durchgeführt. Nach Abkleben der Wellplatte mit Folie und 2-minütiger Zentrifugation bei 2.250 rcf in einer Z300 Zentrifuge (HERMLE) folgte unmittelbar die Analyse im LightCycler 480®. Das im Folgenden tabellarisch dargestellte Standard-Temperatur-Zeit-Protokoll unterschied sich zwischen den Messungen lediglich in der Annealing-Temperatur der einzelnen Primer; die in einer Konzentration von 10 pmol/µl verwendeten Primer sowie die jeweils eingestellte Annealing-Temperatur sind unter IX. (Punkt 6) nachzulesen:

Phase des Programms	Temperatur	Zeitdauer
Aktivierung	95° C	5 min
Amplifikation (40 Zyklen):		
• Denaturierung	95° C	10 s
• Annealing	Annealing-Temperatur	20 s
• Elongation	72° C	20 s
Melting	95° C	1 min
	60° C	1 min
	97° C	∞
Cooling	40° C	10 s

Zur Identifizierung des DNA-Produkts erfolgte im Anschluss an den letzten Elongationsschritt der PCR eine Schmelzkurvenanalyse, da jedes PCR-Produkt eine charakteristische Schmelztemperatur besitzt. Dafür wurden die Fluoreszenzänderungen der einzelnen Proben beim Erhitzen von 60° C auf 97° C aufgenommen.

Für die Durchführung und Auswertung wurde die LightCycler® 480 Software Version LCS480 1.5.0.39 verwendet. Aufgrund der mitgeführten Standardreihe konnte bei der Auswertung der Ergebnisse mit absoluten Zahlenwerten gearbeitet werden, ohne auf die Cps zurückgreifen zu müssen. Prinzipiell war es möglich die für die perfundierten Zellen bestimmte Genexpression direkt mit der der Kontrollzellen zu vergleichen, da stets 1 µg der Gesamt-RNA eingesetzt worden war und sich somit alle ermittelten Werte theoretisch auf dieselbe RNA-Menge bezogen. Problematisch ist allerdings die in der Praxis mitunter stark

schwankende cDNA-Ausbeute bei der Reversen Transkription. Daher wurde zur Sicherheit im Zuge der Auswertung die Menge an spezifischem Produkt zusätzlich auf das Housekeeping-Gen RP L32, das in den untersuchten Ansätzen in konstanter Menge exprimiert wurde, bezogen.

5.4 DNA-Agarosegelelektrophorese

Im Anschluss an die RTqPCR wurden die eingesetzten Primer getestet bzw. die jeweils verwendete Annealing-Temperatur als geeignet bestätigt, indem die Spezifität der entstandenen PCR-Produkte in Form einer Agarosegelelektrophorese verifiziert wurde. Gleichzeitig konnte die erwartete Größe des amplifizierten DNA-Fragments überprüft werden.

5.4.1 Elektrophorese und Detektion der DNA

Die Gelelektrophorese ist eine Methode zur Trennung geladener Teilchen nach Ladung und Größe durch Wanderung im elektrischen Feld. Aufgrund der negativen Ladung der Phosphatgruppen wandern die DNA-Fragmente folglich zur Anode. Ein 2%iges (w/v) Agarosegel (Herstellung siehe IX., 8.2) erwies sich für die zu erwartende Fragmentlänge (100-300 bp) als passend. Nachdem die entsprechenden Ansätze in der Lightcycler-Platte mit je 2 µl 6x DNA Loading Dye vermischt worden waren, um das Einfüllen der DNA-Lösungen in die Geltaschen zu erleichtern, wurden je 10 µl auf das bereits in die Elektrophoresekammer gelegte und mit 1x TBE-Puffer knapp bedeckte Gel aufgetragen. Zum Größenvergleich ließ man eine aus DNA-Fragmenten definierter Länge - in einem Bereich von 100 bis 1.000 bp - bestehende Leiter (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder) als Standard mitwandern. 10 µl davon wurden jeweils in die erste Geltasche pipettiert. Nach Anlegen einer Spannung von 120 V betrug die Laufzeit 45 min, wobei die Elektrophoresefront durch den im Ladepuffer enthaltenen Farbstoff Bromphenolblau verfolgt werden konnte. Zur Sichtbarmachung der PCR-Produkte wurde das Gel für 15-20 min unter mäßigem Schwenken im Ethidiumbromidbad (0,2 µl/ml) gefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff EtBr interkaliert dabei zwischen die Basen der DNA und wird unter UV-Licht sichtbar. Zur Dokumentation wurden die Gele abschließend in der UV-Transillumination fotografiert.

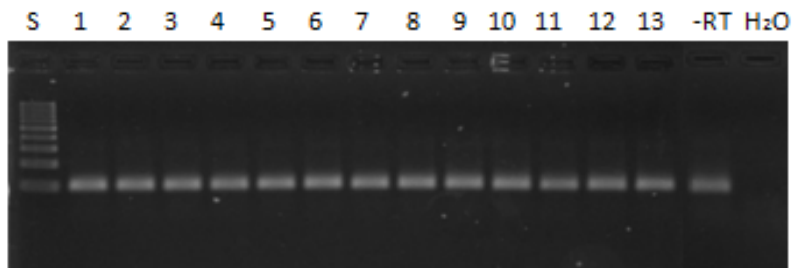
5.4.2 Interpretation der Gelfotos

Tatsächlich wurde das Verfahren der Gelelektrophorese bei erstmals in der beschriebenen Art und Weise angewandten Primern durchgeführt, während bei etablierten Oligonukleotiden die optimale Annealing-Temperatur bereits ausgetestet worden war und somit übernommen werden konnte. Als Anhaltspunkt für die Spezifität der PCR-Produkte und damit der optimalen Annealing-Temperatur galt die Reinheit der detektierten Bande. Daneben wurde die Länge der PCR-Produkte (unter IX., 6. nachzuschlagen) durch Vergleich mit dem Standardmarker kontrolliert. Um mögliche Verunreinigungen durch genomische DNA erkennen zu können, wurden weitestgehend sog. intron-spanning Primer eingesetzt. Diese sind dadurch charakterisiert, dass die Bindungsstelle des forward und reverse Primers auf zwei verschiedenen Exons lokalisiert ist. Die mRNA und damit auch die aus ihr synthetisierte cDNA ist intronfrei, wobei ein Produkt im Bereich von 100-300 bp entsteht. Bei Binden des Primers an genomische DNA wäre das entstehende Produkt aufgrund des dazwischen liegenden Introns wesentlich größer, sofern die Elongationsdauer im LightCycler ausreichen würde. Für jeden zu testenden Primer wurden stichprobenartig stets PCR-Produkte aus Proben der Kontrollzellen sowie der perfundierten Zellen ausgewählt und als Negativkontrollen der -RT-Ansatz und H₂O-Ansatz aufgetragen.

Bei den Primern des ANP-, BNP-, NPR-A- und NPR-C-Gens konnte auf eine Testung mittels Gelelektrophorese verzichtet werden, da sie vorher bereits erfolgreich in der RTqPCR eingesetzt worden waren. Für alle weiteren Primer wurden Gelfotos angefertigt; dies sind im einzelnen β -Aktin, CDK2, CDK4, RP L32, SGLT1, NHE₃, NEP 24.11, AT_{1A}-Rezeptor. In Abb. 2.8 ist exemplarisch jeweils das Gelfoto für die Primer RP L32 und CDK4 dargestellt. Das erste Gel, das zum Primer RP L32 gehört, zeigte für alle aufgetragenen Proben durchgehend eine relativ scharfe Bande im Bereich der erwarteten Fragmentlänge (100 bp), sodass sich die gewählte Annealing-Temperatur von 60° C als geeignet bestätigte. Nach Auftragen des H₂O-Ansatzes waren idealerweise keine PCR-Produkte nachzuweisen. In der -RT-Spur, der zweiten Negativkontrolle, war eine Bande abzugrenzen; allerdings lag der Cp dieses Produkts in der RTqPCR bei über 30, sodass eine vernachlässigbar geringe Konzentration angenommen werden kann. Analog dazu konnte bei der zum Primer CDK4 gehörenden Gelelektrophorese eine kräftige Bande in den Probenspuren detektiert werden, die mit der geforderten Produktlänge (290 bp) vereinbar war. Infolge der Erhöhung der Annealing-Temperatur auf 62° C konnte somit von einer spezifischen Bindung des Primers ausgegangen werden, wohingegen sich bei 60° C noch eine deutliche Doppelbande abgebildet

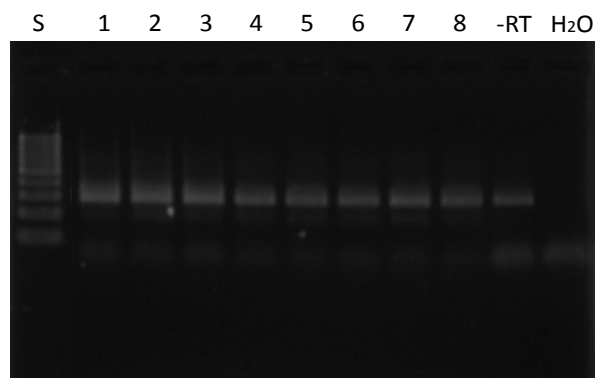
hatte. Die beiden Negativkontrollen waren in derselben Weise wie beim vorhergehenden Gel zu interpretieren.

Agarosegelelektrophorese: **Primer RP L32**



S: 100bp Standardmarker
 Taschen 1-7: Proben der perfundierten Zellen
 Taschen 8-13: Proben der Kontrollzellen
 Negativ-Kontrollen: -RT, H₂O
 Annealing-Temperatur 60°C

Agarosegelelektrophorese: **Primer CDK4**



S: 100bp Standardmarker
 Taschen 1-4: Proben der perfundierten Zellen
 Taschen 5-8: Proben der Kontrollzellen
 Negativ-Kontrollen: -RT, H₂O
 Annealing-Temperatur: 62°C

Abb. 2.8: Verifizierung der RTqPCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese

6. Immunologische Methode: Enzym-Immunoassay (EIA) zur Konzentrationsbestimmung der natriuretischen Peptide ANP und BNP im Perfusat

Da Hormone im Allgemeinen nur in äußerst geringen Konzentrationen vorliegen, musste zur Bestimmung der Konzentration von ANP und BNP im Superfusionsmedium primärer proximaler Tubuluszellen auf eine sehr empfindliche immunchemische Nachweismethode, den Enzym-Immunoassay, zurückgegriffen werden. Als Untersuchungsmaterial dienten die nach 24-stündiger Perfusion beim Ernten von PTC abpipettierten und in 2 ml Eppendorf-Cups überführten Überstände, die wegen der Instabilität der Hormone sofort bei -80° C eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung gelagert wurden. Um Vergleichswerte zu generieren, wurden auch die Überstände der Kontrollzellen aufbewahrt und vermessen. Die Ermittlung der Hormonkonzentrationen erfolgte mit Hilfe zweier EIA-Kits (Phoenix Pharmaceuticals, USA) für ANP und BNP, deren Messbereich von 0-100 ng/ml reichte, gemäß der Beschreibung des Herstellerprotokolls.

Das Vorgehen basierte dabei sowohl für die ANP- als auch für die BNP-Bestimmung grundsätzlich auf dem Prinzip des „kompetitiven“ EIA: Die im Kit enthaltene Mikrotiterplatte ist mit einem sekundären Antikörper beschichtet, der das Fc-Fragment des primären Antikörpers binden kann. Dabei konkurriert das in den Proben enthaltene Zielpeptid bzw. das Standardpeptid mit dem hinzugegebenen biotinylierten Peptid um die Bindung an das Fab-Fragment des primären Antikörpers. Die nach Inkubation und mehreren Waschschritten hinzugefügte Streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP) interagiert mit dem gebundenen biotinylierten Peptid und katalysiert anschließend die Substratreaktion mit folgender Gelbfärbung der Lösung. Hierbei verhält sich die erzeugte Farbintensität umgekehrt proportional zur Konzentration des Zielpeptids (ANP/BNP) in der Probe bzw. in den Standardlösungen. Mittels eines Mikrotiterplattenphotometers (Sunrise Absorbance Reader, TECAN, Austria; Magellan 2) wurde schließlich die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Durch das Erstellen einer Standardkurve anhand der mitgeführten Proben bekannter Konzentration (1.000 bis 0,01 ng/ml) konnten die ANP- bzw. BNP-Konzentrationen im Perfusat berechnet werden.

7. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Versuche wurden in den Graphen als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Bei der statistischen Auswertung der

Messdaten wurden dabei zunächst die Werte aus n unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gemittelt, die Standardabweichung (SD) berechnet und schließlich der Standardfehler ermittelt ($SEM = SD/\sqrt{n}$). n steht hier für die Anzahl der Versuche. Zur Prüfung der Ergebnisse auf Signifikanz wurde in Microsoft Office Excel 2007 als parametrischer Test der t-Test für zwei verbundene Stichproben (paired t-Test) angewandt. Dieser t-Test wird für sog. „gepaarte“ Proben verwendet, wie sie in der Zellkultur vorkommen, wenn die Kontrollzellen und die dazugehörigen behandelten Zellen von der gleichen Zelllinienpassage stammen oder in der Primärkultur aus denselben Tieren isoliert wurden. So werden größere Variationen z. B. zwischen Passagen nicht in die Berechnung des p-Wertes miteinbezogen. Ereignisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $< 5\%$ ($p < 0,05$) wurden als statistisch signifikant festgelegt und in den Abbildungen mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Von einem hoch signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen war bei einem p-Wert $< 0,001$ auszugehen; diese Irrtumswahrscheinlichkeit wurde in den Graphen mittels zweier Rauten (##) markiert.

Detailliertere Angaben zu den verwendeten Zellen bzw. Tieren, Geräten, Medien, Chemikalien, Oligonukleotiden und sonstigen Materialien sowie eine ergänzende Beschreibung gängiger Standardmethoden sind im Abschnitt IX. (Materialien und Methoden) nachzulesen.

III. Ergebnisse

Alle angestellten Untersuchungen konzentrieren sich auf Veränderungen im proximalen Tubulus der Niere, da dieser von der kompensatorischen renalen Hypertrophie neben einem vergrößerten Glomerulusvolumen hauptsächlich betroffen ist, wohingegen die distalen Tubulusabschnitte verhältnismäßig wenig hypertrophieren. [1]

Die im Folgenden dargestellten in vitro-Ergebnisse stammen zum größten Teil aus Untersuchungen an primären proximalen Tubuluszellen der Maus. Ergänzende Experimente mit LLC-PK₁-Zellen, einer porcinen proximalen Tubuluszelllinie [27], sollen lediglich verdeutlichen, dass es sich bei dem aufgezeigten Phänomen um einen generellen Mechanismus handelt, der vom Zellmodell unabhängig ist.

1. Direkte konzentrationsabhängige Wirkung natriuretischer Peptide auf primäre proximale Tubuluszellen

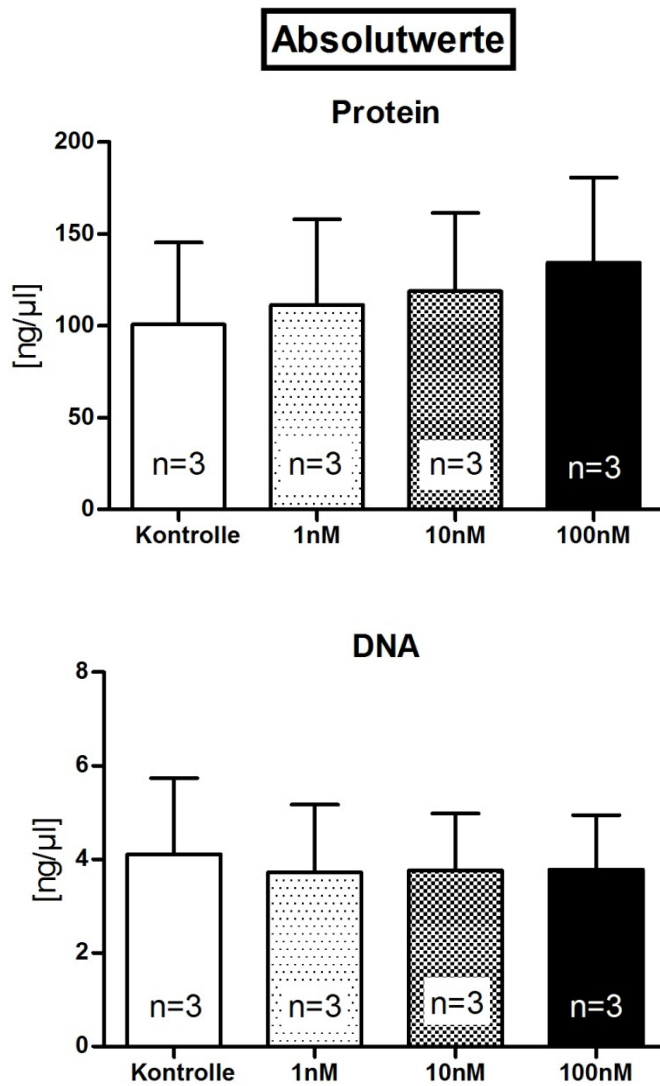
Im ersten Teil der Arbeit sollte zunächst geklärt werden, ob die natriuretischen Peptide ANP und BNP grundsätzlich in der Lage sind, über eine direkte Wirkung auf primäre proximale Tubuluszellen der Maus (C57BL/6) eine Hypertrophie zu induzieren.

1.1 Konzentrationsabhängige Hypertrophie infolge ANP-Stimulation

Die Stimulation der PTC mit ANP wurde in 24 Well-Platten bei konfluentem Zellrasen vorgenommen. Dabei wurden die Zellen für 24 Stunden mit 1 nM, 10 nM bzw. 100 nM ANP inkubiert und anschließend ihr Proteingehalt sowie ihre DNA-Konzentration bestimmt. Die Hypertrophie eines Gewebes ist - im Gegensatz zur Hyperplasie - definiert als Zunahme der Zellgröße bei konstanter Zellzahl. Demnach kommt es bei der Hypertrophie zu einer Zunahme des Protein/DNA-Verhältnisses. Die Hyperplasie dagegen geht mit einer Zunahme der Zellzahl und damit des DNA-Gehalts einher. [1] Als Maß zur Beurteilung der Stärke der induzierten Hypertrophie diente folglich die Zunahme der Proteinkonzentration im Verhältnis zur DNA (Protein/DNA-Ratio).

Abb. 3.1 zeigt jeweils die Absolutwerte der Protein- bzw. DNA-Konzentration sowie der Ratio bei Stimulation mit steigender ANP-Konzentration. Wegen der Variabilität der Ausgangswerte der Kontrollzellen zwischen den Versuchen wurde zusätzlich eine

Normierung vorgenommen, sodass jeweils die Kontrolle dem Wert 1,0 entspricht und alle anderen Werte als Vielfaches der Kontrolle angegeben werden können. Diese Relativwerte sind in Abb. 3.2 dargestellt.



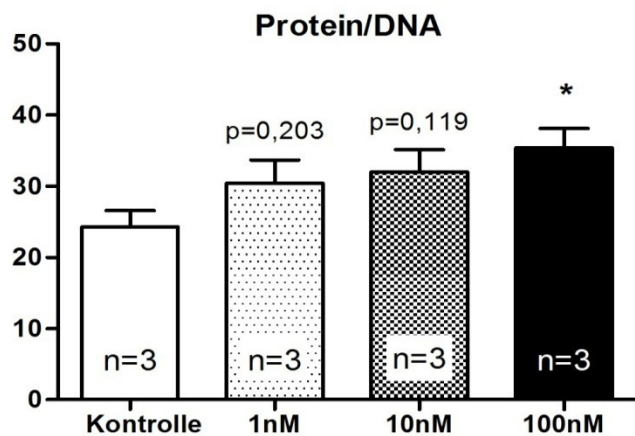
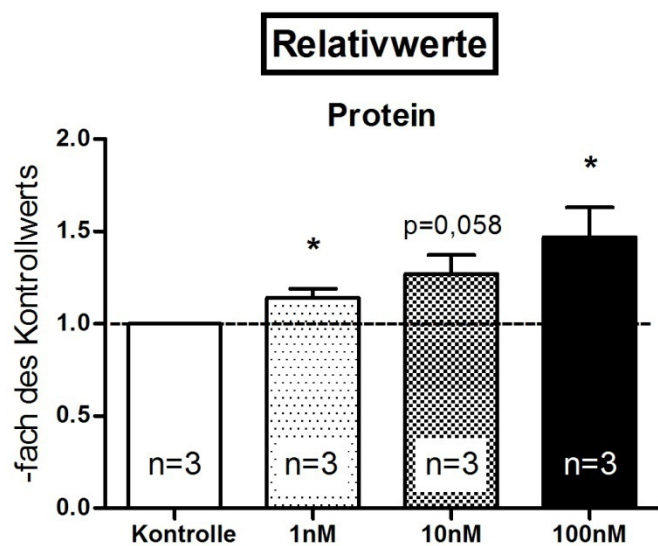


Abb. 3.1: Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein/DNA-Verhältnis der proximalen Tubuluszellen (Wildtyp) nach Inkubation (24 h) mit steigenden ANP-Konzentrationen
* $p < 0,05$ vs. Kontrolle



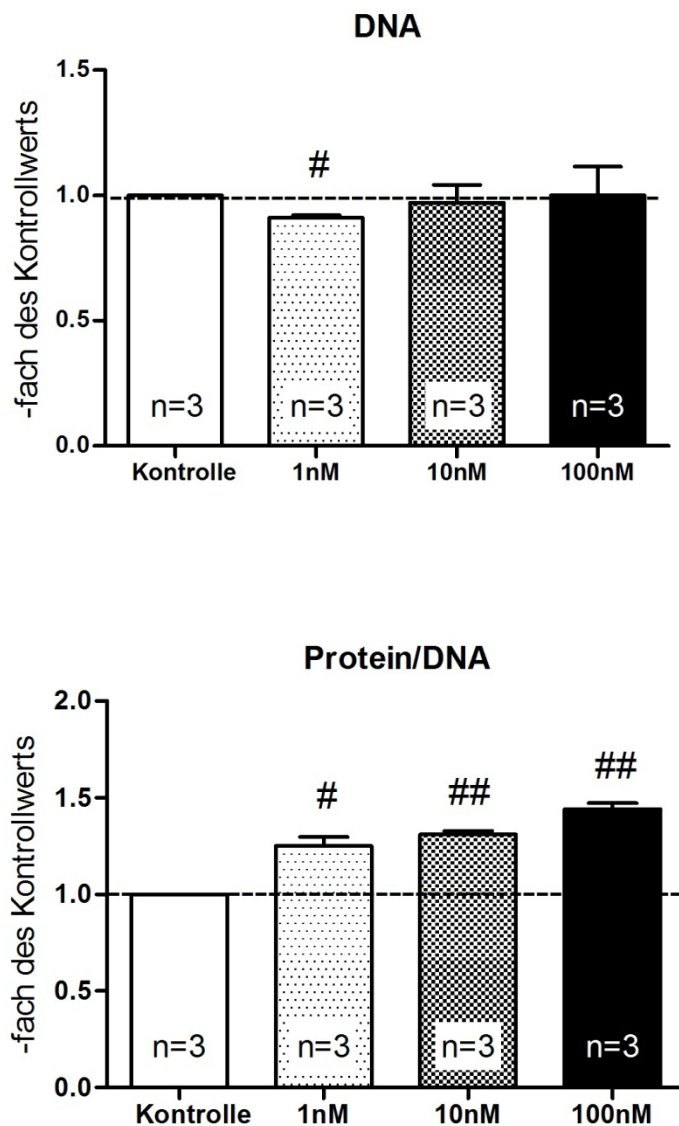


Abb. 3.2: Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein/DNA-Verhältnis der proximalen Tubuluszellen (Wildtyp) nach Inkubation (24 h) mit steigenden ANP-Konzentrationen

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle

$p < 0,01$ vs. Kontrolle

$p < 0,001$ vs. Kontrolle

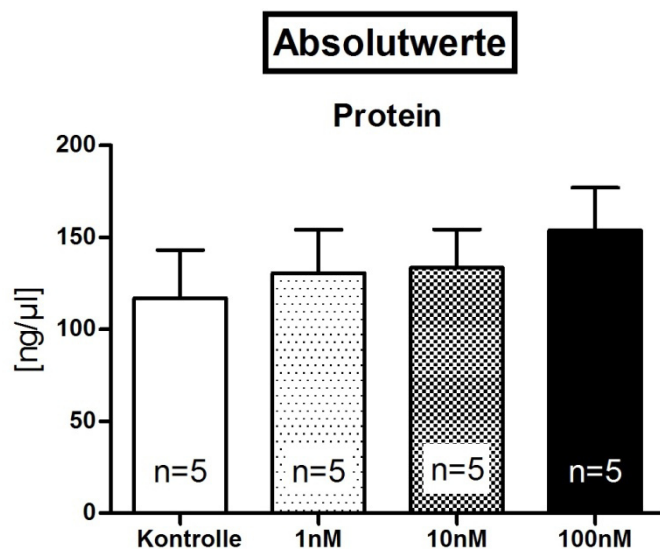
Die Graphen zeigen deutlich, dass die mit ANP inkubierten Zellen ihre Proteinsynthese im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen steigerten anstatt zu proliferieren. Der Proteingehalt stieg dabei durch Stimulation um 14 % (1 nM), 27 % (10 nM) bzw. 47 % (100 nM) an (Abb. 3.2 erster Graph). Dagegen war keine vermehrte DNA-Bildung festzustellen. Als Ausdruck der Hypertrophie wiesen demzufolge die stimulierten Zellen eine signifikante

Zunahme ($p < 0,01$ bzw. $0,001$) des Protein/DNA-Verhältnisses um 25 % (1 nM), 31 % (10 nM) bzw. 44 % (100 nM) auf (Abb. 3.2 dritter Graph).

ANP verfügt somit tatsächlich über eine direkte Wirkung auf primäre proximale Tubuluszellen. Darüber hinaus lässt sich eine Konzentrationsabhängigkeit der ausgelösten Hypertrophie erkennen. Der größte Effekt wird dabei mit einer ANP-Konzentration von 100 nM erreicht, weshalb in folgenden Versuchen immer diese ermittelte optimale Konzentration eingesetzt wurde.

1.2 Konzentrationsabhängige Hypertrophie infolge BNP-Stimulation

Zur Untersuchung der BNP-Wirkung wurden dieselben Versuchsbedingungen wie bei der ANP-Stimulation unter 1.1 gewählt.



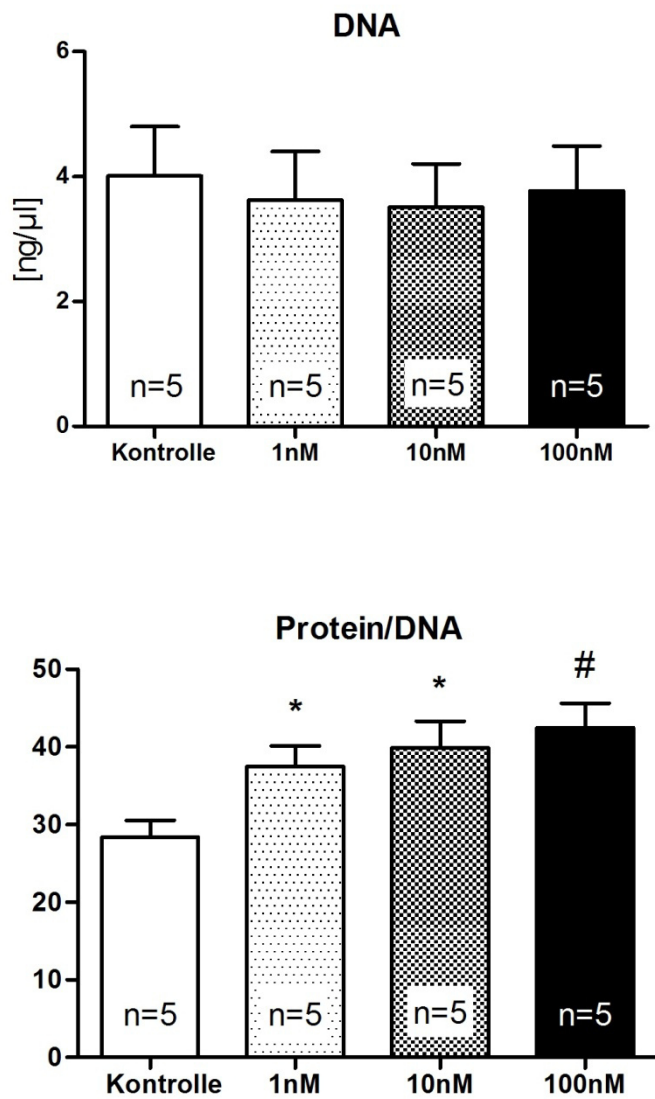


Abb. 3.3: Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein/DNA-Verhältnis der proximalen Tubuluszellen (Wildtyp) nach Inkubation (24 h) mit steigenden BNP-Konzentrationen
* $p < 0,05$ vs. Kontrolle
$p < 0,01$ vs. Kontrolle

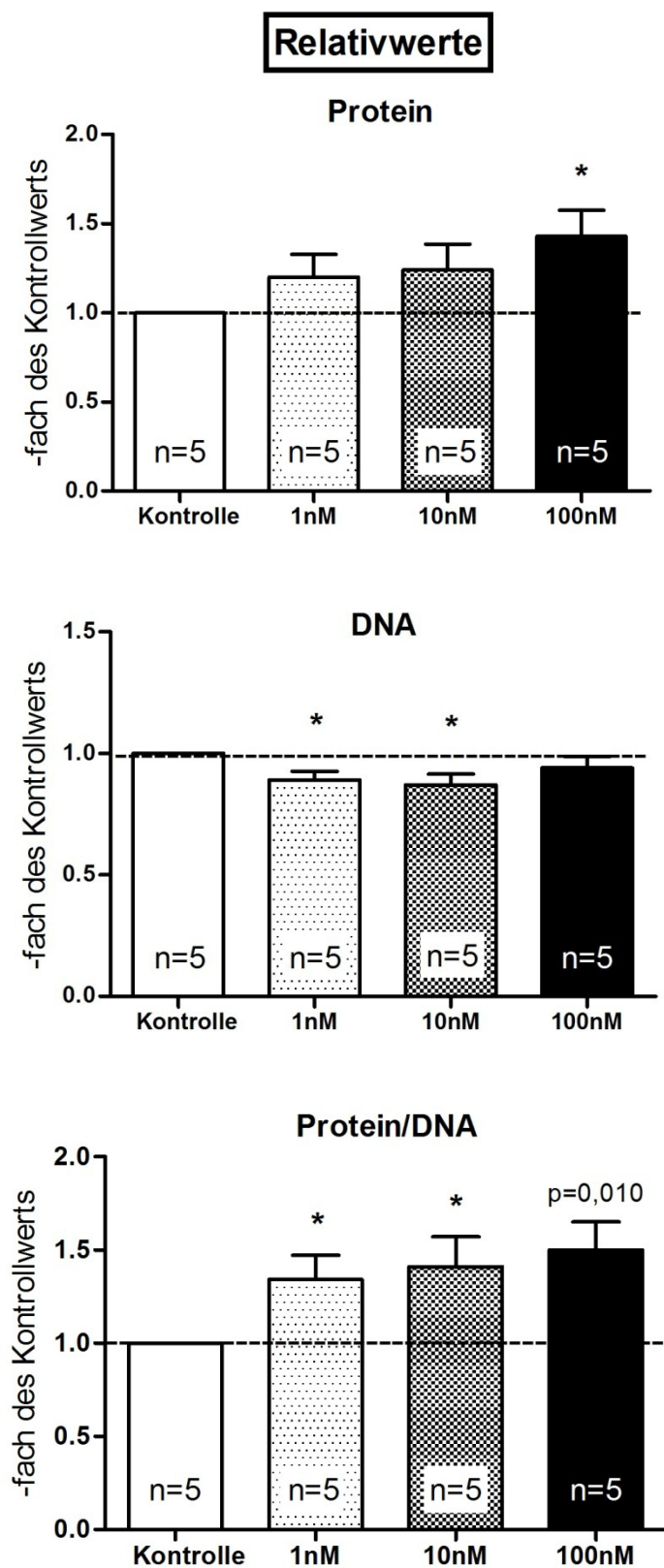


Abb. 3.4: Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein/DNA-Verhältnis der proximalen Tubuluszellen (Wildtyp) nach Inkubation (24 h) mit steigenden BNP-Konzentrationen
 * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Auch nach Stimulation der Zellen mit BNP zeigte sich eine deutliche Zunahme der Proteinkonzentration um 20 % (1 nM), 24 % (10 nM) bzw. 43 % (100 nM) gegenüber den Kontrollzellen (Abb. 3.4 erster Graph), wohingegen der DNA-Gehalt tendentiell eher abnahm. Die Protein/DNA-Ratio als Zeichen der Hypertrophie nahm abhängig von der BNP-Konzentration signifikant ($p < 0,05$ bzw. $p = 0,01$) um 34 % (1 nM), 41 % (10 nM) bzw. 50 % (100 nM) zu (Abb. 3.4 dritter Graph).

Diese Daten zeigen, dass BNP ebenso wie ANP in vitro grundsätzlich auch direkt eine Hypertrophie proximaler Tubuluszellen verursachen kann. Auch für die BNP-Stimulation ergab sich eine deutliche Dosis-Wirkungskurve, welche die Konzentrationsabhängigkeit des Ausmaßes der Hypertrophie veranschaulicht. Eine maximale Hypertrophie konnte bei der höchsten getesteten BNP-Konzentration von 100 nM erzielt werden.

Die Erkenntnis, dass die natriuretischen Peptide (ANP, BNP) zumindest in vitro eine direkt wachstumsfördernde Wirkung auf proximale Tubuluszellen haben, bildet die Voraussetzung für die aufgestellte Hypothese, dass eine lokale Produktion natriuretischer Peptide infolge des erhöhten tubulären Flusses mitverantwortlich für die Hypertrophie ist.

2. Charakterisierung des verwendeten Zellmodells

Gemäß einer gängigen Hypothese, der sog. „workload“-Hypothese, führt die Mehrbelastung des proximalen Tubulus infolge des erhöhten tubulären Flusses zur Auslösung des Wachstums der proximalen Tubuluszellen. [1, 45, 49] In vivo ergibt sich diese erhöhte tubuläre Belastung durch eine Hyperfiltration als Folge des Verlustes von funktionsfähigem Nierengewebe. Um die Mechanismen, über die ein Anstieg der GFR eine Tubulushypertrophie induzieren kann, in vitro genauer untersuchen zu können, wurde ein Superfusionsmodell verwendet. Dabei kann in Perfusionskammern die verstärkte tubuläre Beladung durch die entsprechend eingestellte Flussrate des Mediums imitiert werden. Im folgenden Abschnitt der Arbeit galt es, das verwendete Zellmodell zu charakterisieren und grundsätzlich die Möglichkeit einer flussinduzierten Hypertrophie als Voraussetzung für anschließende Untersuchungen nachzuweisen.

2.1 Hypertrophie von primären proximalen Tubuluszellen infolge Superfusion

Für die Perfusionsversuche wurden primäre proximale Tubuluszellen aus der Maus isoliert und in 24 Well-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde die Superfusion dieser Wildtyp-Zellen in serum- und hormonfreiem Medium für 24 Stunden mit einer Flussrate von 0,5 mm/s vorgenommen. In vorausgehenden Versuchen hatte sich nämlich eben diese Strömungsgeschwindigkeit für PTC als ideal erwiesen. Bei einer höheren Flussrate von 1 mm/s kam es dagegen gehäuft zum Auftreten von Zellschäden sowie partieller Ablösung der Zellen von der Unterlage. Als Kontrolle dienten statisch mit serum- und hormonfreiem Medium inkubierte PTC. Im Anschluss wurde die Protein- und DNA-Konzentration der perfundierten Zellen sowie der Kontrollzellen ermittelt.

Abb. 3.5 zeigt die Ergebnisse der Protein- und DNA-Bestimmung sowie das berechnete Protein/DNA-Verhältnis als Absolutwerte. Wegen der Schwankungen der Ausgangswerte der Kontrollzellen zwischen den Versuchen wurde eine Normierung vorgenommen. Abb. 3.6 stellt das Protein/DNA-Verhältnis der perfundierten Zellen als Vielfaches der statischen Kontrolle dar.

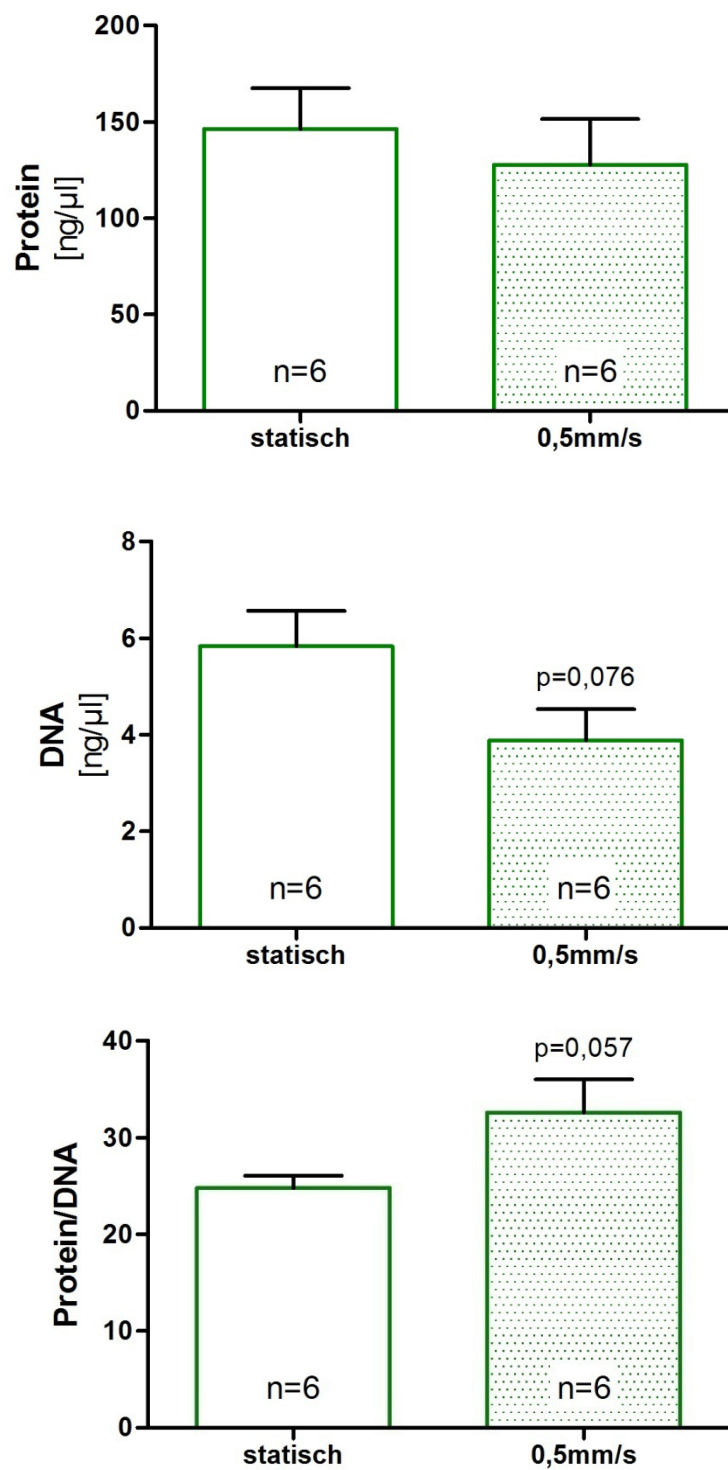
Absolutwerte:

Abb. 3.5: Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein/DNA-Verhältnis von PTC (Wt-Zellen) statisch bzw. nach Perfusion (24 h, 0,5 mm/s)

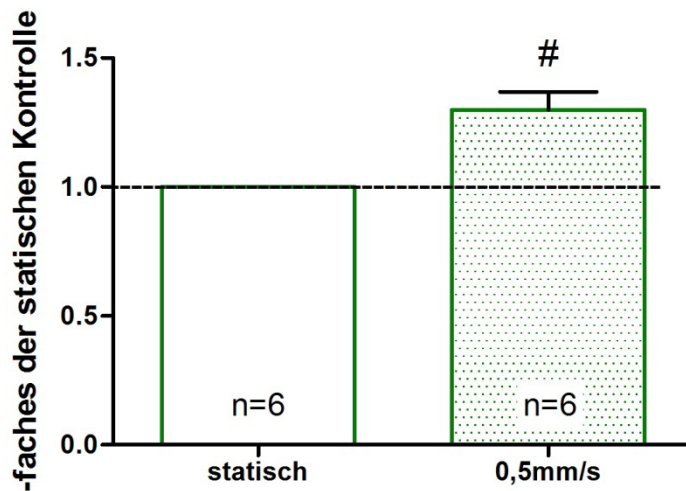
Relativwerte:

Abb. 3.6: Protein/DNA-Verhältnis von PTC (Wt-Zellen) statisch bzw. nach Perfusion (24 h, 0,5 mm/s)
 # $p < 0,01$ vs. statischer Kontrolle

Die perfundierten Zellen wiesen als Zeichen der flussinduzierten Hypertrophie eine signifikante Zunahme ($p < 0,01$) des Proteingehalts in Bezug auf die DNA-Konzentration (Protein/DNA-Ratio) um 30 % gegenüber den Kontrollzellen auf (Abb. 3.6). Für dieses Zellmodell kann demnach angenommen werden, dass die Perfusion eine Hypertrophie der proximalen Tubuluszellen auslöst und deshalb auch für weitere Untersuchungen im Zusammenhang mit der „workload“-Hypothese geeignet ist.

2.2 Hypertrophie von LLC-PK₁-Zellen infolge Superfusion

Um zu zeigen, dass dieses Phänomen der flussinduzierten Hypertrophie nicht modellabhängig ist, wurde ergänzend auch eine porcine proximale Tubuluszelllinie, die sog. LLC-PK₁-Zellen, herangezogen. Die Perfusion erfolgte analog zu den Flusseexperimenten der PTC unter 2.1 für 24 Stunden, allerdings mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 mm/s. Die LLC-PK₁-Zellen zeigten sich nämlich im Vergleich zu den PTC deutlich widerstandsfähiger, sodass problemlos die höhere Flussrate von 1 mm/s beibehalten werden konnte. Als Maß für die Hypertrophie diente wiederum das Protein/DNA-Verhältnis der perfundierten Zellen im Vergleich zu dem der statischen Kontrollzellen.

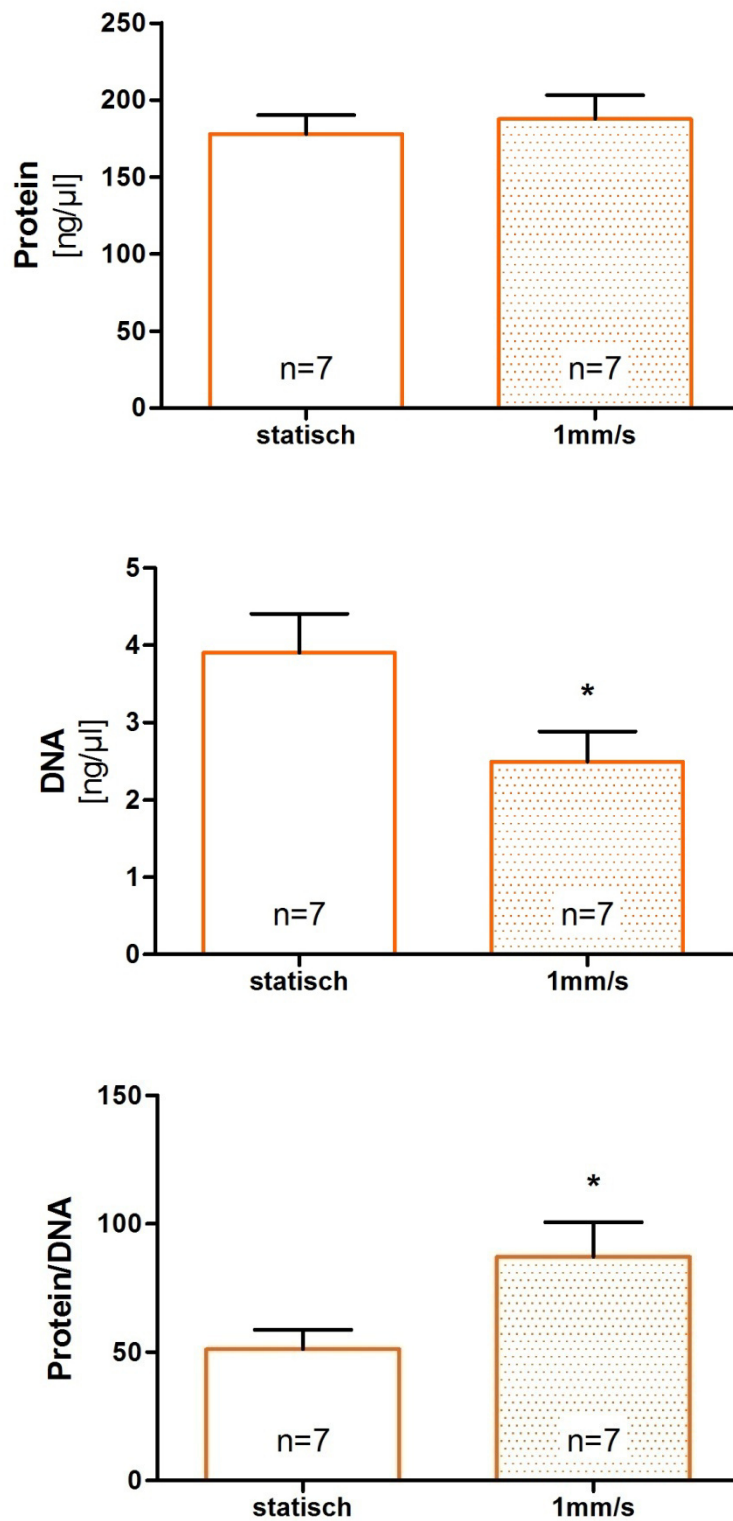
Absolutwerte:

Abb. 3.7: Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein/DNA-Verhältnis von LLC-PK₁-Zellen statisch bzw. nach Perfusion (24 h, 1 mm/s)

* $p < 0,05$ vs. statischer Kontrolle

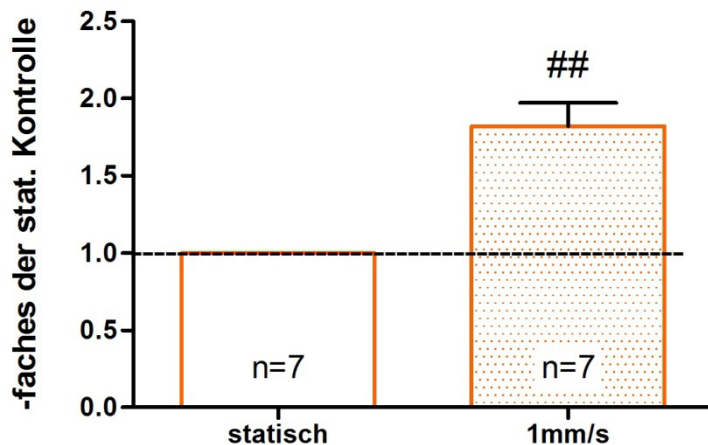
Relativwerte:

Abb. 3.8: Protein/DNA-Verhältnis von LLC-PK₁-Zellen statisch bzw. nach Perfusion (24 h, 1 mm/s)
 ## p < 0,001 vs. statischer Kontrolle

Die in Abb. 3.7 dargestellten Absolutwerte zeigen bereits deutlich, dass auch in diesem Zellmodell durch die Perfusion eine Hypertrophie ausgelöst werden konnte. Die perfundierten LLC-PK₁-Zellen steigerten ihre Proteinsynthese anstatt zu proliferieren, was mit einer Zunahme der Zellgröße - ohne Zunahme der Zellzahl - verbunden ist. Als Ausdruck dieser flussbedingten Hypertrophie war die Protein/DNA-Ratio der perfundierten Zellen im Bezug auf die Kontrolle deutlich erhöht. Nach Normierung (Abb. 3.8) errechnet sich ein signifikanter Anstieg ($p < 0,001$) des Protein/DNA-Verhältnisses um 82 % verglichen mit den Kontrollzellen. Diese Daten bestätigen, dass das Phänomen der flussinduzierten Hypertrophie auch in diesem Zellmodell Gültigkeit hat und somit einen generellen Mechanismus darstellt.

2.3 Perfusionsabhängige Genexpression in primären proximalen Tubuluszellen

Zur Etablierung des in weiteren Versuchen verwendeten Modells der primären proximalen Tubuluszellen der Maus sollte die Expression verschiedener Gene, die bei der flussinduzierten Hypertrophie bekannterweise von Bedeutung sind, in diesem Zellmodell untersucht werden.

Aus den Nieren von C57BL/6-Mäusen isolierte PTC wurden hierfür unter denselben Versuchsbedingungen (24 Stunden, 0,5 mm/s) wie unter 2.1 beschrieben perfundiert. Als Kontrolle wurden statisch mit serum- und hormonfreiem Medium inkubierte Zellen mitgeführt. Mittels quantitativer Echtzeit-PCR (RTqPCR: Real-time quantitative PCR) konnte anschließend die Konzentration der transkribierten mRNA des untersuchten Gens in den perfundierten Zellen sowie in den Kontrollzellen ermittelt werden. Die bestimmte mRNA-Konzentration galt als Maß für die Genexpression, sodass ein Vergleich der perfundierten Zellen mit den Kontrollzellen Aussagen zur Regulation der Genexpression bei der flussbedingten Hypertrophie zulässt.

2.3.1 Perfusionsabhängige Genexpression der Housekeeping-Gene RP L32 und Aktin

Zunächst wurde die Expression von zwei Housekeeping-Genen, die allgemein als nicht regulierte Gene gelten, in diesem Zellmodell bestimmt, um eine Bezugsgröße für die im Weiteren untersuchten regulierten Gene zu erhalten. Dabei wurde zum einen β -Aktin - das am häufigsten vorkommende Protein in eukaryontischen Zellen - gewählt, welches durch Ausbildung von Mikrofilamenten eine wichtige Rolle als Strukturelement der Zelle sowie bei Bewegungsvorgängen spielt. Zum anderen wurde die Genexpression des ribosomalen Proteins L32, eine Komponente der großen 60S-Untereinheit der eukaryontischen Ribosomen im Cytoplasma, nach Perfusion sowie in den Kontrollzellen ermittelt. [33] Bei β -Aktin und RP L32 handelt es sich um Gene, die in praktisch allen Zellen exprimiert werden.

Für die Auswertung wurde jeweils die Genexpression von RP L32 und β -Aktin in den perfundierten Zellen derjenigen in den Kontrollzellen gegenübergestellt. Dabei stellt Abb. 3.9 die Absolutwerte der mittels RTqPCR ermittelten mRNA-Konzentrationen dar. Anders als vermutet zeigte sich in diesem Modell eine Regulation von β -Aktin. Bei den perfundierten Zellen war eine Abnahme der mRNA-Konzentration auf 76 % der Kontrolle zu beobachten. Beim ribosomalen Protein L32 dagegen verhielt es sich wie erwartet: Die mRNA-Konzentration und damit die Genexpression blieb von der Perfusion völlig unbeeinflusst. Die Berechnung des Mittelwerts aus 5 unabhängigen Experimenten ergab für die Kontrollzellen einen Wert von 1,260, für die perfundierten Zellen von 1,242 ($p = 0,894$). Daraus ließ sich folgern, dass RP L32 als Housekeeping-Gen in diesem Zellmodell tatsächlich keiner Regulation unterliegt.

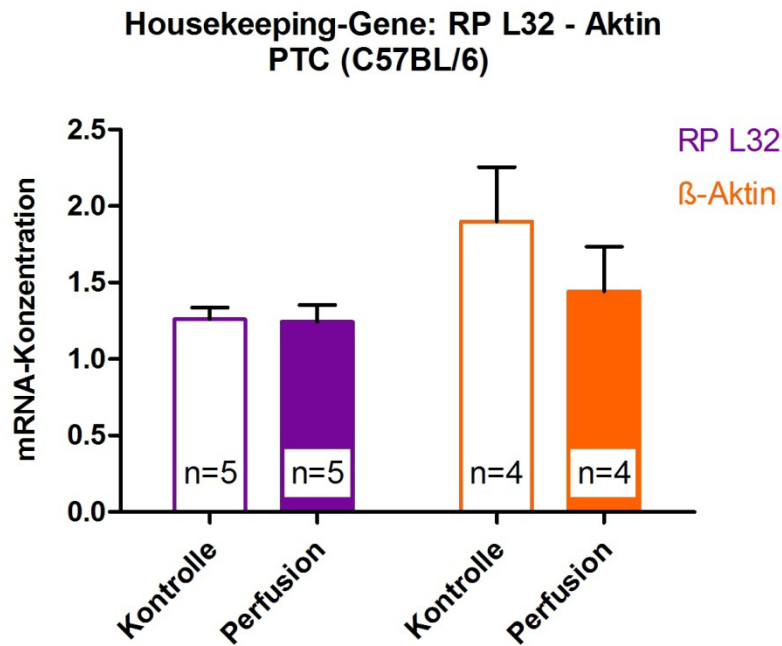


Abb. 3.9: Renale Expression der Housekeeping-Gene RP L32 und β -Aktin in primären proximalen Tubuluszellen: perfundierte PTC (24 h, 0,5 mm/s) vs. Kontrollzellen (Bestimmung der Genexpression mittels RTqPCR)

Aufgrund der Erkenntnis, dass RP L32 im verwendeten Modell im Gegensatz zu β -Aktin nicht reguliert ist, wurden die im Folgenden untersuchten regulierten Gene stets auf das Housekeeping-Gen RP L32 bezogen. Dadurch können die auftretenden Veränderungen in der Expression verschiedener Gene als Folge der Perfusion und der damit verbundenen Hypertrophie interpretiert werden.

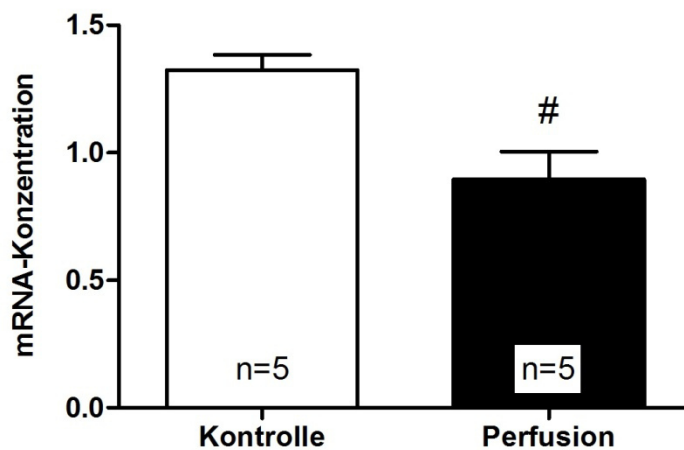
2.3.2 Perfusionsabhängige Genexpression der Cyclin-abhängigen Kinasen CDK2 und 4

Nachdem in der Literatur ein zellzyklusabhängiger Mechanismus der renalen tubulären Hypertrophie beschrieben ist, war es naheliegend zur besseren Charakterisierung des Zellmodells die Genexpression der dabei entscheidend beteiligten Cyclin-abhängigen Kinasen CDK2 bzw. CDK4 zu betrachten. Ausschlaggebend für das Zustandekommen einer Hypertrophie ist der Zellzyklusarrest in der G₁-Phase und damit verbunden eine Blockade des Eintritts der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus. Da die CDK4 im Komplex mit Cyclin D und die CDK2 im Komplex mit Cyclin E (aktivierte Form) in der frühen bzw. späten G₁-

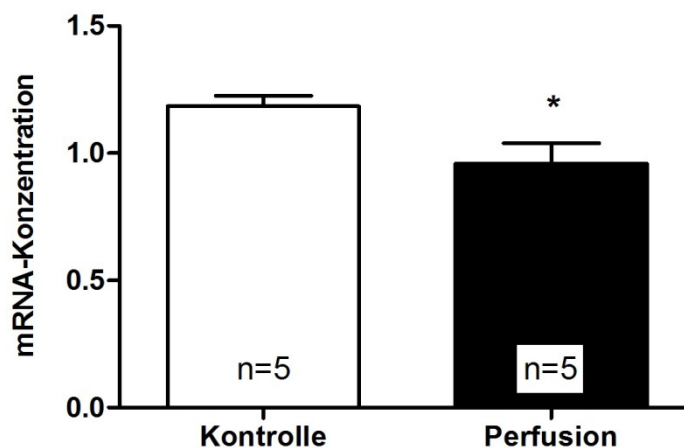
Phase das Fortschreiten des Zellzyklus regulieren, kommt ihnen eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung der Hypertrophie zu. [7, 9]

In der Auswertung wurde der mit Hilfe der RTqPCR ermittelte mRNA-Gehalt des CDK2-Gens sowie des CDK4-Gens der Kontrollzellen mit dem der perfundierten Zellen verglichen. In Abb. 3.10 sind die mRNA-Konzentrationen als absolute Werte aufgetragen. Dabei zeichnet sich bei Perfusion eine signifikante Abnahme der Expression sowohl der CDK2 als auch der CDK4 ab. Die mRNA der CDK2 sank auf 67,7 % der Kontrolle ab ($p = 0,009$), die der CDK4 auf 81,0 % der Kontrolle ($p = 0,036$). Wie bereits beschrieben blieb die Expression des RP L32 unverändert.

Genexpression: CDK2



Genexpression: CDK4



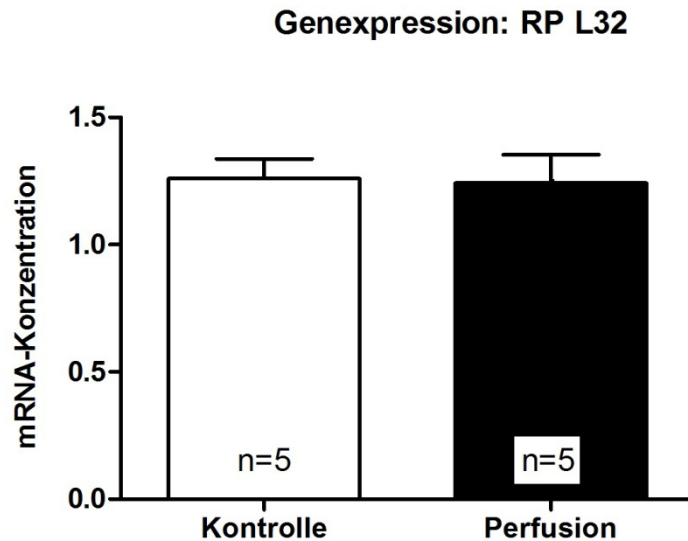


Abb. 3.10: Renale CDK2-, CDK4- und RP L32-Expression in primären proximalen Tubuluszellen: perfundierte PTC (24 h, 0,5 mm/s) vs. Kontrollzellen (Bestimmung der Genexpression mittels RTqPCR)

* $p < 0,05$ vs. Kontrollzellen

$p < 0,01$ vs. Kontrollzellen

Des Weiteren wurden im Rahmen der Auswertung die jeweiligen Werte der CDK2- bzw. CDK4-Expression auf das Housekeeping-Gen RP L32 bezogen. Abb. 3.11 veranschaulicht die infolge der Quotientenbildung erhaltenen Ergebnisse. Das Verhältnis CDK2/RP L32 nahm perfusionsabhängig signifikant ($p = 0,033$) auf 69,1 % der Kontrollzellen ab. Auch bei der Ratio CDK4/RP L32 war eine allerdings nicht signifikante Abnahme auf 82,0 % in den superfundierten bzw. hypertrophierten Zellen zu beobachten ($p = 0,096$).

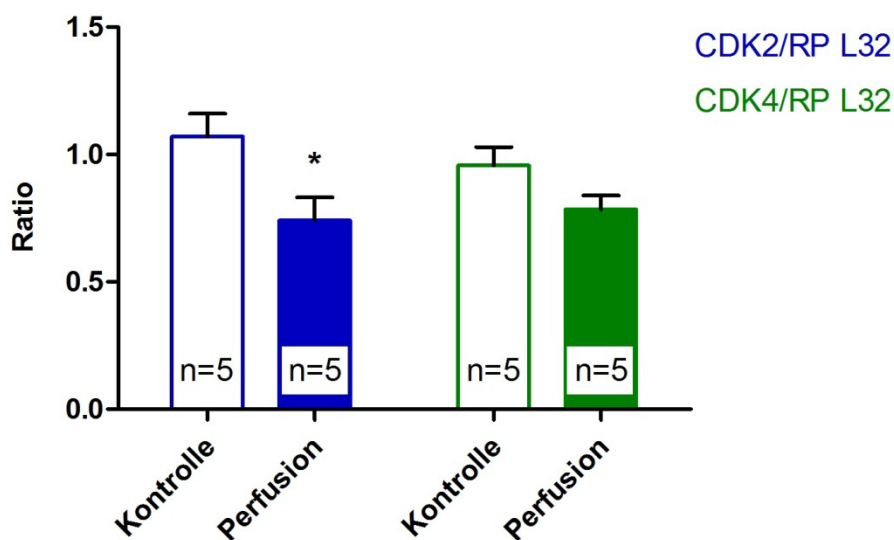


Abb. 3.11: Renale CDK2- bzw. CDK4-Expression in primären proximalen Tubuluszellen bezogen auf RP L32-Expression: perfundierte PTC (24 h, 0,5 mm/s) vs. Kontrollzellen (Bestimmung der Genexpression mittels RTqPCR)
 * $p < 0,05$ vs. Kontrollzellen

Aus den geschilderten Veränderungen in der Genexpression der Cyclin-abhängigen Kinasen im Zusammenhang mit der tubulären Hypertrophie im in vitro-Flussmodell geht hervor, dass es sich um regulierte Gene handelt. Dabei stehen diese Ergebnisse im Einklang mit der flussinduzierten Hypertrophie der proximalen Tubuluszellen: Voraussetzung für die Entstehung einer Hypertrophie ist die Hemmung der CDK2/Cyclin E-Kinaseaktivität, um den Eintritt der Zellen in die S-Phase zu verhindern. [7] Dazu passt die signifikante Herunterregulation der CDK2 wie sie in Abb. 3.11 dargestellt ist. Somit bestätigt diese Untersuchung die Fähigkeit der PTC in diesem Modell auf einen erhöhten Fluss mit einer Hypertrophie zu reagieren.

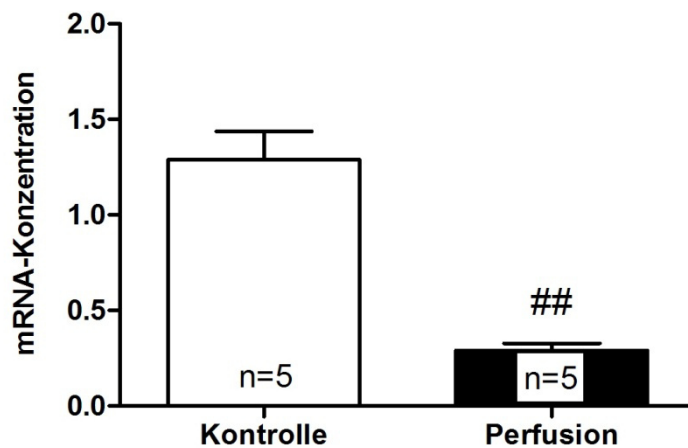
2.3.3 Perfusionsabhängige Genexpression der natriuretischen Peptidrezeptoren NPR-A und -C

Bei der Etablierung des Zellmodells auf mRNA-Ebene war des Weiteren die Expression der natriuretischen Peptidrezeptoren im proximalen Tubulus von zentralem Interesse, besonders weil sowohl die natriuretischen Peptide als auch ihre Rezeptoren eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellwachstums spielen. [158, 262, 263] Der natriuretische Peptidrezeptor A, aufgrund seiner Struktur auch als Guanylatcyclase-A (GC-A) bezeichnet, stellt dabei den gemeinsamen Rezeptor der natriuretischen Peptide ANP, BNP und Urodilatin dar und vermittelt ihre funktionellen Effekte. Dagegen fungiert der im Folgenden ebenfalls untersuchte natriuretische Peptidrezeptor C vor allem als Clearance-Rezeptor, indem er durch Internalisation und anschließende lysosomale Degradation die lokale ANP- bzw. BNP-Konzentration reguliert. [13, 22] Trotz starker Expression beider Rezeptoren in der Niere ist bislang nur wenig über ihre Expression im proximalen Tubulus bekannt.

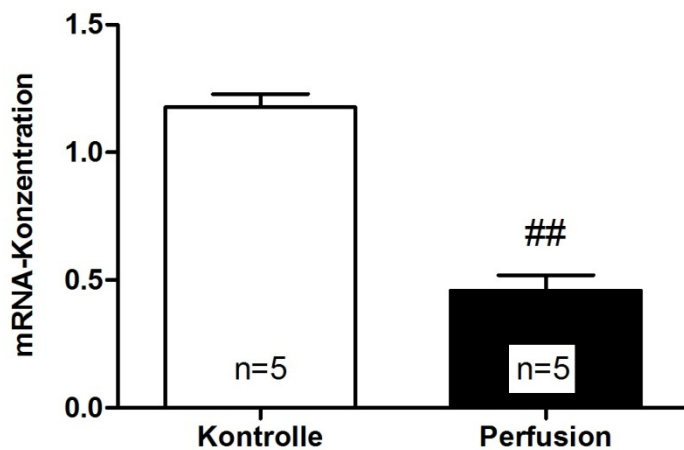
Als Grundlage für die Bestimmung der Genexpression des NPR-A und NPR-C mit Hilfe der RTqPCR dienten dieselben Proben, aus denen die CDK2- bzw. CDK4-Expression (Abschnitt 2.3.2) ermittelt wurde. Parallel dazu wurde wiederholt die RP L32-Expression als Bezugsgröße mit gemessen. Dabei bestätigte sich das Ergebnis für das Housekeeping-Gen wie unter 2.3.1 dargestellt. Die mRNA-Konzentration als Zeichen der Genexpression wurde für beide Rezeptoren sowohl in den Kontrollzellen als auch in den für 24 Stunden

perfundierten Zellen bestimmt und in Abb. 3.12 in Form von absoluten Werten vergleichend aufgetragen. Wie aus Abb. 3.12 abzulesen ist, kam es bei den perfundierten Zellen zu einer hoch signifikanten Abnahme ($p < 0,001$) der Genexpression beider betrachteter Rezeptoren. Die NPR-C-mRNA sank dabei auf 22,6 % des Kontrollwerts ab, die NPR-A-mRNA auf 39,0 %.

Genexpression: NPR-C



Genexpression: NPR-A



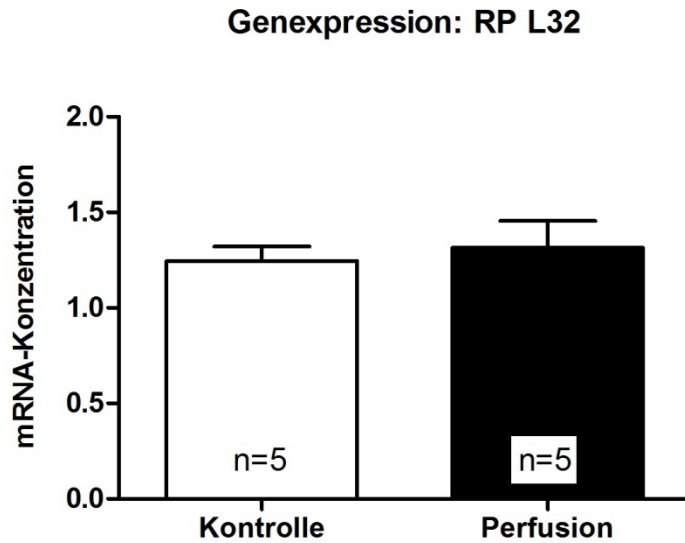


Abb. 3.12: Renale NPR-C-, NPR-A- und RP L32-Expression in primären proximalen Tubuluszellen: perfundierte PTC (24 h, 0,5 mm/s) vs. Kontrollzellen (Bestimmung der Genexpression mittels RTqPCR)
$p < 0,001$ vs. Kontrollzellen

Um den erhaltenen Werten mehr Aussagekraft beimessen zu können, wurden sie zur mRNA-Konzentration des nicht regulierten ribosomalen Proteins L32 in Beziehung gesetzt. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abb. 3.13 zusammengefasst. Sowohl NPR-C als auch NPR-A unterliegen infolge der Superfusion offensichtlich einer Regulation. Nach 24 Stunden Perfusion war die mRNA-Synthese des NPR-C im Verhältnis zu RP L32 auf weniger als ein Viertel (22,0 %) des Kontrollwerts reduziert. Analog verhielt es sich auch bei NPR-A: Hier kam es ebenfalls zu einer hoch signifikanten Abnahme auf 37,4 % des Vergleichswerts.

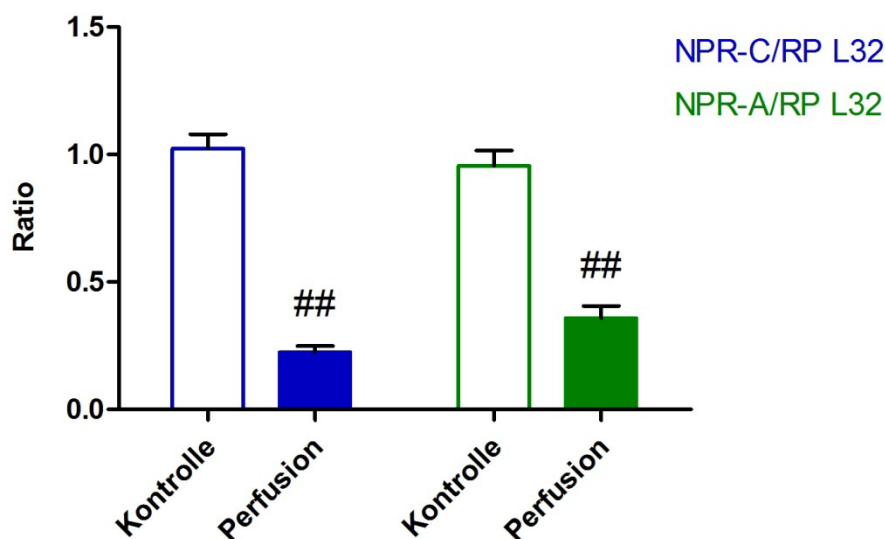


Abb. 3.13: Renale NPR-C- bzw. NPR-A-Expression in primären proximalen Tubuluszellen bezogen auf RP L32-Expression (pro Gruppe n = 5):
 perfundierte PTC (24 h, 0,5 mm/s) vs. Kontrollzellen
 (Bestimmung der Genexpression mittels RTqPCR)
 ## p < 0,001 vs. Kontrollzellen

Zusammenfassend ergab sich aus dem Experiment eine eindeutige Herunterregulation sowohl der Guanylatcyclase-A als auch des Clearance-Rezeptors in den perfundierten primären proximalen Tubuluszellen. Dieses Ergebnis passt gut zur zentralen Rolle der natriuretischen Peptide im Rahmen der renalen tubulären Hypertrophie: Eine Herabregulation des Clearance-Rezeptors, verbunden mit einer verminderten Elimination der NPs, bedingt eine längere Halbwertszeit und damit höhere Konzentration der biologisch aktiven NPs. Als Folge der ständigen Ligandenbindung kommt es demnach auch zu einer Herunterregulation des NPR-A. Die aufgestellte Hypothese, dass eine lokale Produktion und folglich autokrine bzw. parakrine Wirkung der natriuretischen Peptide induziert durch den erhöhten tubulären Fluss die Hypertrophie auslöst, wird durch diese Daten untermauert.

2.3.4 Perfusionsabhängige Genexpression der neutralen Endopeptidase 24.11 (NEP)

Aufgrund der enormen Bedeutung der natriuretischen Peptide (NPs) im Kontext der kompensatorischen renalen Hypertrophie schien es sinnvoll Mechanismen zu betrachten, die an der Regulation der Konzentration der NPs beteiligt sind. Eine wichtige Komponente stellt die Inaktivierung der NPs dar, an der neben dem unter 2.3.3 erwähnten NPR-C auch die neutrale Endopeptidase 24.11 beteiligt ist. NEP ist eine membrangebundene zinkabhängige Metallopeptidase, die in der Niere hauptsächlich im Bürstensaum der proximalen Tubuli gefunden wird. [15, 204-206]

Nachdem bereits eine Herabregulation des NPR-C im in vitro-Flussmodell festgestellt worden war, sollte nun in einem weiteren Versuch geklärt werden, wie sich die mRNA-Synthese der NEP bei superfundierten proximalen Tubuluszellen im Vergleich zu den statisch inkubierten Kontrollzellen verhält. Dazu wurde mittels der RTqPCR die mRNA der NEP in 24 Stunden perfundierten Zellen und Kontrollzellen quantifiziert und die ermittelten Absolutwerte in Abb. 3.14 graphisch dargestellt. Die mRNA-Konzentration der NEP nahm dabei in den perfundierten Zellen auf 56,4 % des Kontrollwerts ab. Ebenfalls in Abb. 3.14 dargestellt ist die wiederholt parallel durchgeführte Bestimmung der RP L32-Genexpression, deren Werte

auch für die im Abschnitt 2.3.5 vorgenommene Auswertung als Bezugswerte dienen.

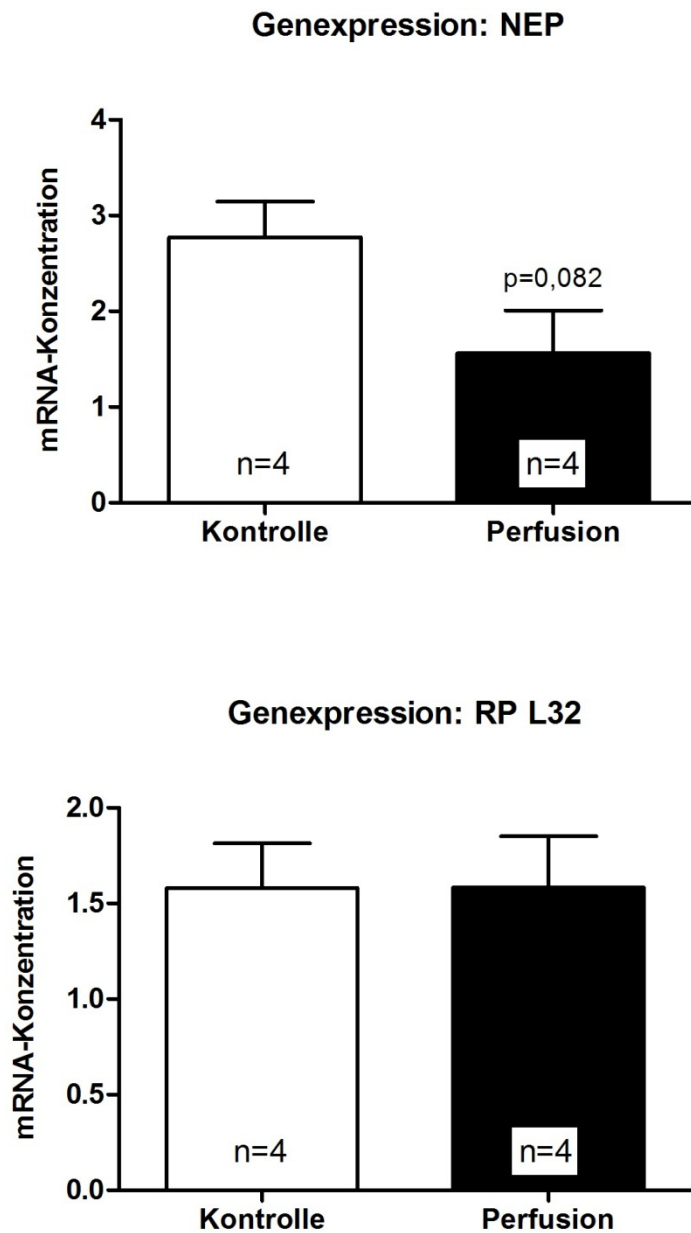


Abb. 3.14: Renale NEP- und RP L32-Expression in primären proximalen Tubuluszellen: perfundierte PTC (24 h, 0,5 mm/s) vs. Kontrollzellen (Bestimmung der Genexpression mittels RTqPCR)

Die renale NEP-Expression wurde nun erneut auf das Housekeeping-Gen RP L32 bezogen und die dadurch erhaltenen Werte in Abb. 3.15 zur Veranschaulichung aufgetragen. Aus den Daten ließ sich folgern, dass es sich bei der neutralen Endopeptidase ebenfalls um ein

reguliertes Gen handelt. Dabei verhielten sich die Genexpression des Clearance-Rezeptors und der NEP gleichsinnig. Bei Superfusion der Zellen kam es zu einer signifikanten ($p = 0,014$) Abnahme der NEP-mRNA in Bezug auf RP L32 auf fast die Hälfte (53,0 %) der Kontrollzellen.

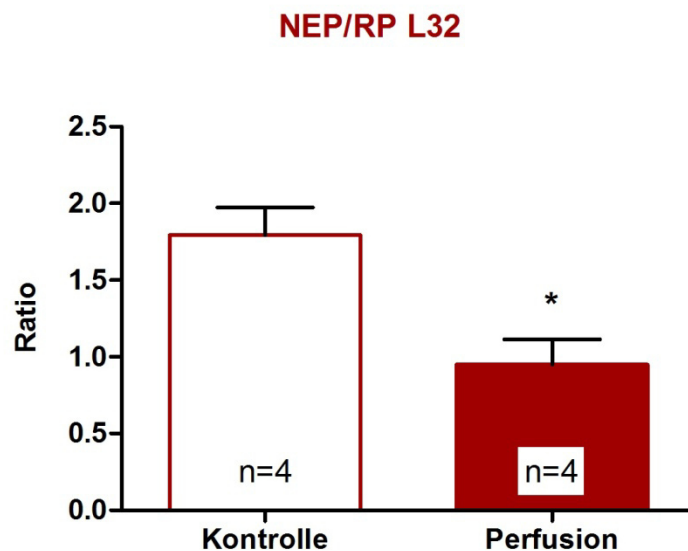


Abb. 3.15: Renale NEP-Expression in primären proximalen Tubuluszellen bezogen auf RP L32-Expression: perfundierte PTC (24 h, 0,5 mm/s) vs. Kontrollzellen (Bestimmung der Genexpression mittels RTqPCR)

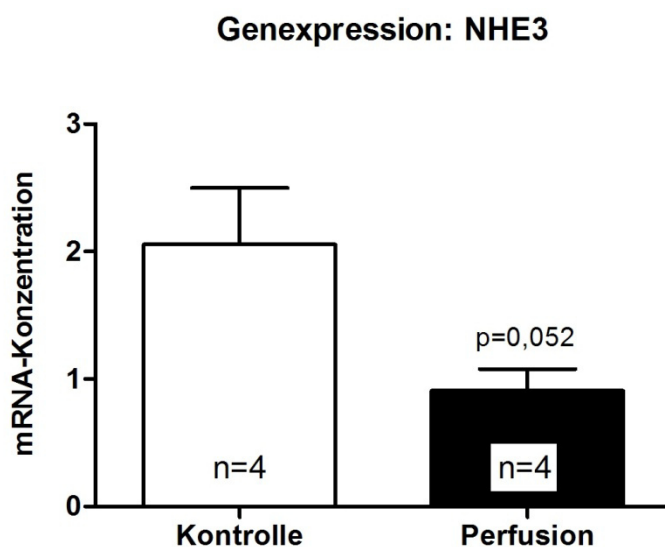
* $p < 0,05$ vs. Kontrollzellen

Insgesamt scheinen im untersuchten Zellmodell die Mechanismen, die zur Elimination der biologisch wirksamen NPs beitragen, bei Imitation eines erhöhten tubulären Flusses im in vitro-Flussmodell weniger aktiv zu sein. Die reduzierte Genexpression des NPR-C sowie der NEP, die als Hauptkomponenten der Degradation der NPs anzusehen sind, ist konsequenterweise mit einer erhöhten Konzentration der NPs assoziiert. Somit ist dieses Ergebnis wiederum gut vereinbar mit der Rolle der NPs bei der flussinduzierten Hypertrophie und bestätigt die vormals erwähnte Hypothese der lokalen Produktion der NPs im proximalen Tubulus.

2.3.5 Perfusionsabhängige Genexpression der renalen Transporter SGLT1 und NHE₃ sowie des AT_{1A}-Rezeptors

Abschließend wurden zur Charakterisierung des verwendeten Zellmodells noch zwei für den proximalen Tubulus typische Transporter genauer untersucht, da das mit einem erhöhten tubulären Fluss einhergehende gesteigerte Substratangebot auch eine verstärkte Transporteraktivierung vermuten ließ. Im Zusammenhang mit der renalen Hypertrophie ist in der Literatur vor allem eine Beteiligung des Na⁺/Glucose-Symporters (SGLT) und Na⁺/H⁺-Antiporters (NHE₃) beschrieben [1, 16, 17], weshalb diese für den folgenden Versuch gewählt wurden. Der vor allem gegen Ende des proximalen Tubulus in der luminalen Membran lokalisierte SGLT1 transportiert als Cotransporter sekundär aktiv ein Glucosemolekül zusammen mit zwei Na⁺-Ionen in die Zelle. [34] Ebenfalls sekundär aktiv wird durch den NHE₃ ein H⁺-Ion im Austausch gegen ein Na⁺-Ion in das Tubuluslumen abgegeben. [34, 35]

Die für 24 Stunden mit einer Flussrate von 0,5 mm/s perfundierten PTC sowie Kontrollzellen dienten auch hier als Grundlage für die RNA-Gewinnung, die nach Umschreiben in cDNA für die Durchführung der RTqPCR verwendet wurde. Zunächst sind in Abb. 3.16 die absoluten Werte der mRNA-Konzentration aufgetragen. Es zeigte sich bei beiden Transportern eine verminderte Expression nach 24-stündiger Superfusion der Zellen. Beim NHE₃ nahm der mRNA-Gehalt auf 44,2 %, beim SGLT1 analog auf 35,2 % verglichen mit den Kontrollzellen ab.



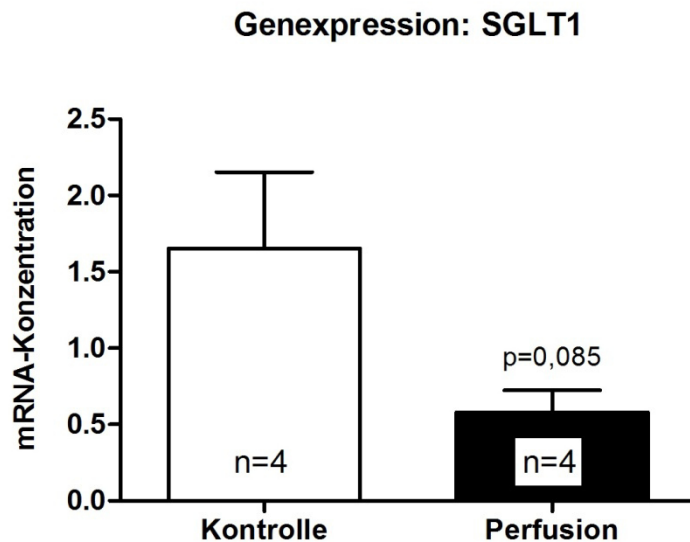


Abb. 3.16: Renale NHE₃- und SGLT1-Expression in primären proximalen Tubuluszellen: perfundierte PTC (24 h, 0,5 mm/s) vs. Kontrollzellen (Bestimmung der Genexpression mittels RTqPCR)

Abb. 3.17 verdeutlicht die renale NHE₃- bzw. SGLT1-Expression bezogen auf RP L32. Anders als erwartet kam es bei den untersuchten Transportern zu einer Herunterregulation in den superfundierten Zellen. Die NHE₃-Expression nahm auf 47,3 % ($p = 0,193$) des Vergleichswerts ab, die SGLT1-Expression auf 32,6 % ($p = 0,073$).

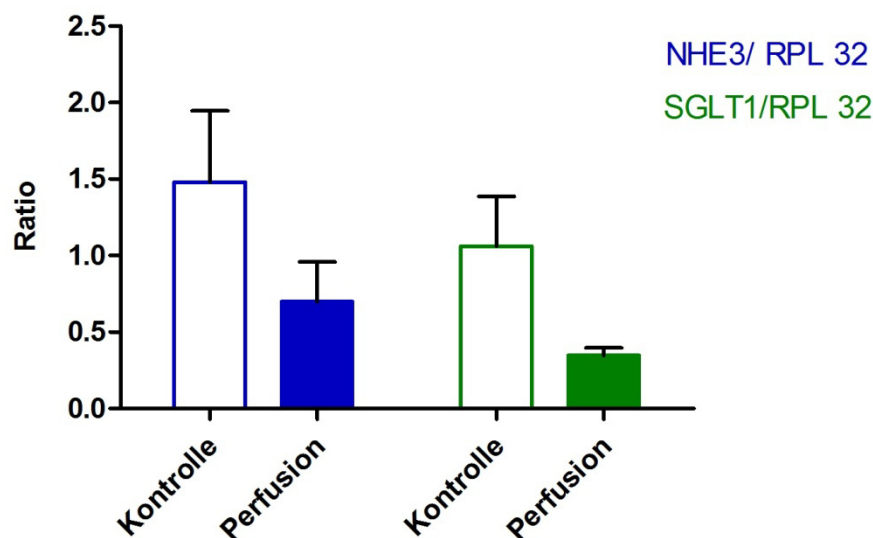


Abb. 3.17: Renale NHE₃- bzw. SGLT1-Expression in primären proximalen Tubuluszellen bezogen auf RP L32-Expression (pro Gruppe n = 4): perfundierte PTC (24 h, 0,5 mm/s) vs. Kontrollzellen (Bestimmung der Genexpression mittels RTqPCR)

Die in der Literatur beschriebene Zunahme der Transporteraktivität im Zusammenhang mit einer tubulären Hypertrophie konnte somit im verwendeten in vitro-Flussmodell auf mRNA-Ebene nicht bestätigt werden. Vielmehr war für beide Transporter eine ausgeprägte Reduktion in der Expression nachzuweisen.

Darüber hinaus war die renale Expression des AT_{1A}-Rezeptors von Interesse, da Angiotensin II über AT₁-Rezeptoren seine hypertrophieinduzierende Wirkung entfalten kann. [18] Allerdings war aufgrund zu geringer Konzentrationen der AT_{1A}-Rezeptor-mRNA in den Proben keine Auswertung möglich.

Insgesamt konnte dieser Abschnitt der Arbeit zur Etablierung des verwendeten Zellmodells beitragen sowie generell die Fähigkeit der PTC (Wildtyp) zur Entwicklung einer flussinduzierten Hypertrophie im in vitro-Modell nachweisen. Die gezeigte Abhängigkeit der Hypertrophie der PTC von der Perfusion bzw. vom erhöhten tubulären Fluss - zumindest in vitro - bildet die grundlegende Voraussetzung des Modells für die anschließende genauere Untersuchung der Mechanismen, über die eine erhöhte tubuläre Belastung die Tubulushypertrophie initiieren kann.

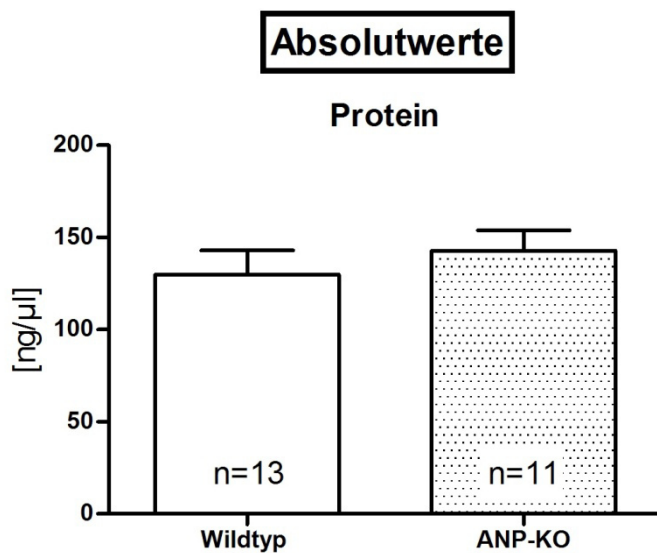
3. In vitro-Untersuchungen zum Einfluss einer lokalen ANP-/Urodilatinproduktion bei der flussinduzierten Hypertrophie primärer proximaler Tubuluszellen

Im Folgenden sollen anhand des bereits charakterisierten in vitro-Modells die bei der Ausbildung der flussinduzierten Hypertrophie beteiligten Mechanismen betrachtet werden. Dabei stehen insbesondere die natriuretischen Peptide im Mittelpunkt der Untersuchungen, nachdem aus Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe (Dr. Andrea Schreiber) an PTC aus GC-A-KO-Mäusen bereits eine Beteiligung der NPs abgeleitet werden konnte. Auch aus in der Literatur beschriebenen Untersuchungen zur Lokalisation lässt sich auf eine intrarenale Synthese und damit mögliche autokrine bzw. parakrine Wirkung von ANP und Urodilatin beim kompensatorischen Nierenwachstum schließen. [20, 54, 56, 57, 183] Konkret geht es hier nun um die aufgestellte Hypothese, dass eine lokale Produktion natriuretischer Peptide, insbesondere ANP bzw. Urodilatin, als Folge des erhöhten tubulären Flusses die Hypertrophie induziert. Urodilatin entsteht dabei nur in der Niere durch alternative Prozessierung des ANP-Vorläuferpeptids. [8, 22] Um zu sehen, inwieweit die direkte Wirkung von ANP bzw. Urodilatin eine Rolle spielt, wurden primäre proximale Tubuluszellen aus ANP-KO-Mäusen verwendet, bei denen sowohl die ANP- als auch die Urodilatin-Bildung aufgehoben ist.

3.1 Vergleich der Basalwerte von Wildtyp-Zellen und ANP-Knockout-Zellen

Um in den folgenden Versuchen einen Vergleich der Hypertrophie der Wildtyp-Zellen und ANP-KO-Zellen zu ermöglichen, musste zunächst geklärt werden, ob beide Zelltypen unbehandelt, d.h. vor Superfusion oder Stimulation, dieselbe Protein- und DNA-Konzentration aufweisen. Zum Ausschluss eines bereits zu Beginn der Versuche vorliegenden Größenunterschieds der zwei Zelltypen wurden parallel primäre proximale Tubuluszellen aus ANP-KO-Mäusen und deren Wildtyp-Geschwistern isoliert. Nachdem die konfluenten PTC entsprechend den Kontrollzellen in den Stimulations- bzw. Perfusionsversuchen in 24 Well-Platten für 24 Stunden mit serum- und hormonfreiem Medium statisch inkubiert worden waren, wurde der Protein- und DNA-Gehalt pro Well bestimmt. Als Maß für die Zellgröße wurde die Protein/DNA-Ratio berechnet.

In Abb. 3.18 sind die so ermittelten Basalwerte der Protein- bzw. DNA-Konzentration sowie das Protein/DNA-Verhältnis als absolute Werte jeweils im Vergleich Wildtyp und ANP-Knockout dargestellt.



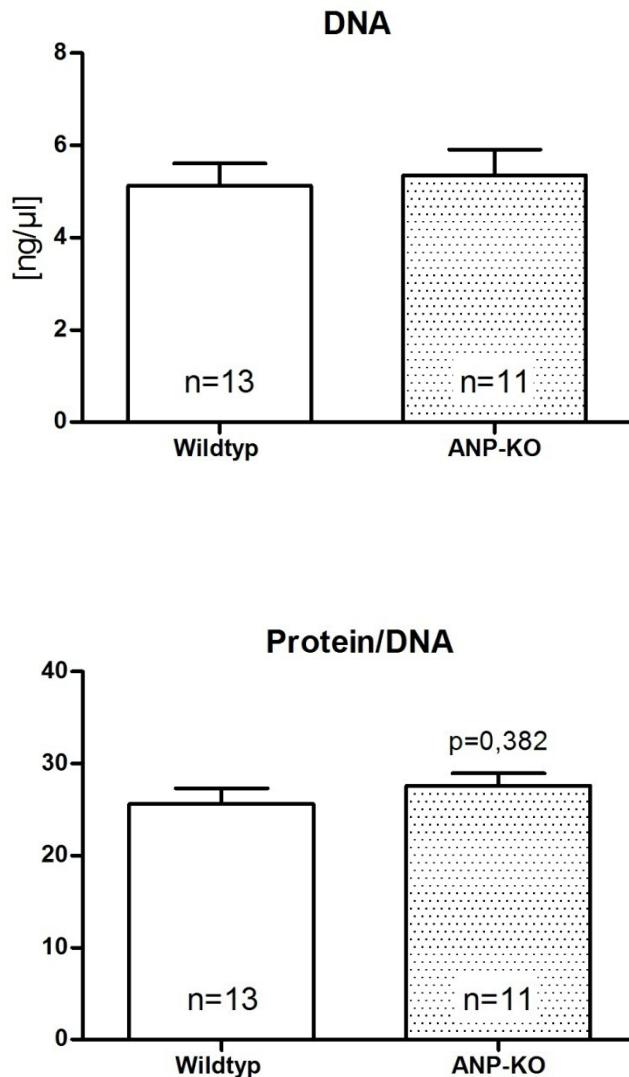


Abb. 3.18: Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein/DNA-Verhältnis von unbehandelten proximalen Tubuluszellen: Wildtyp-Zellen vs. ANP-Knockout-Zellen

Wie aus den Graphen abzulesen ist, wiesen die beiden Zelltypen im unbehandelten Zustand vergleichbare Protein- und DNA-Konzentrationen auf. Folglich ergab sich auch kein signifikanter Unterschied ($p = 0,382$) der Protein/DNA-Ratio zwischen Wildtyp- und ANP-KO-Zellen. Bei den Wildtyp-Zellen betrug die aus 13 unabhängigen Versuchsansätzen gemittelte Ratio 25,6, bei den KO-Zellen errechnete sich aus 11 Versuchsansätzen eine Ratio von 27,6.

Durch diese Daten konnte eine grundlegende Abweichung in der Zellgröße ausgeschlossen werden, sodass in folgenden Versuchen gleiche Ausgangsbedingungen beider Zelltypen angenommen werden können.

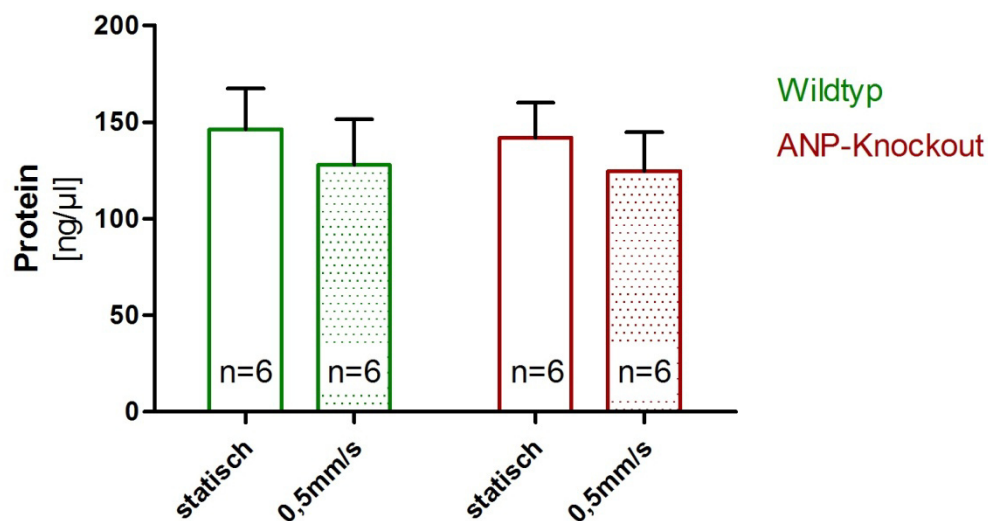
3.2 Hypertrophie von ANP-Knockout-Zellen infolge Superfusion im Vergleich zu Wildtyp-Zellen

Der sich anschließende Versuch befasste sich mit der Frage, ob ANP-KO-Zellen grundsätzlich bedingt durch den Reiz der Perfusion hypertrophieren können. Es sollte also überprüft werden, ob bei Fehlen von ANP und Urodilatin eine flussinduzierte Hypertrophie überhaupt möglich ist. Außerdem wurde die Stärke der ausgelösten Hypertrophie mit der bei Wildtyp-Zellen bereits nachgewiesenen flussinduzierten Hypertrophie verglichen.

Dazu wurden zur gleichen Zeit primäre proximale Tubuluszellen aus ANP-KO-Mäusen und korrespondierenden Wildtyp-Mäusen isoliert und in 24 Well-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Das bewährte in vitro-Perfusionssystem wurde nun eingesetzt, um synchron Wildtyp- und ANP-KO-Zellen für 24 Stunden mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 mm/s zu superfundieren. Für beide Zelltypen wurden jeweils statisch inkubierte Kontrollzellen als Bezugsgröße mitgeführt. Anschließend wurde der Protein- und DNA-Gehalt der proximalen Tubuluszellen bestimmt.

In Abb. 3.19 sind die aus 6 voneinander unabhängigen Versuchen bestimmten und gemittelten Protein- und DNA-Konzentrationen bzw. das Protein/DNA-Verhältnis als absolute Zahlenwerte dargestellt. Sowohl bei den Wildtyp-Zellen als auch bei den ANP-KO-Zellen kam es als Ausdruck der flussinduzierten Hypertrophie zu einer Zunahme der Protein/DNA-Ratio. Bei den Wildtyp-Zellen stieg die Proteinkonzentration im Bezug auf die DNA von 24,8 auf 32,6 (31,4 %) an, während sie bei den ANP-KO-Zellen von 26,7 nur auf 30,1 (12,9 %) anstieg.

Absolutwerte:



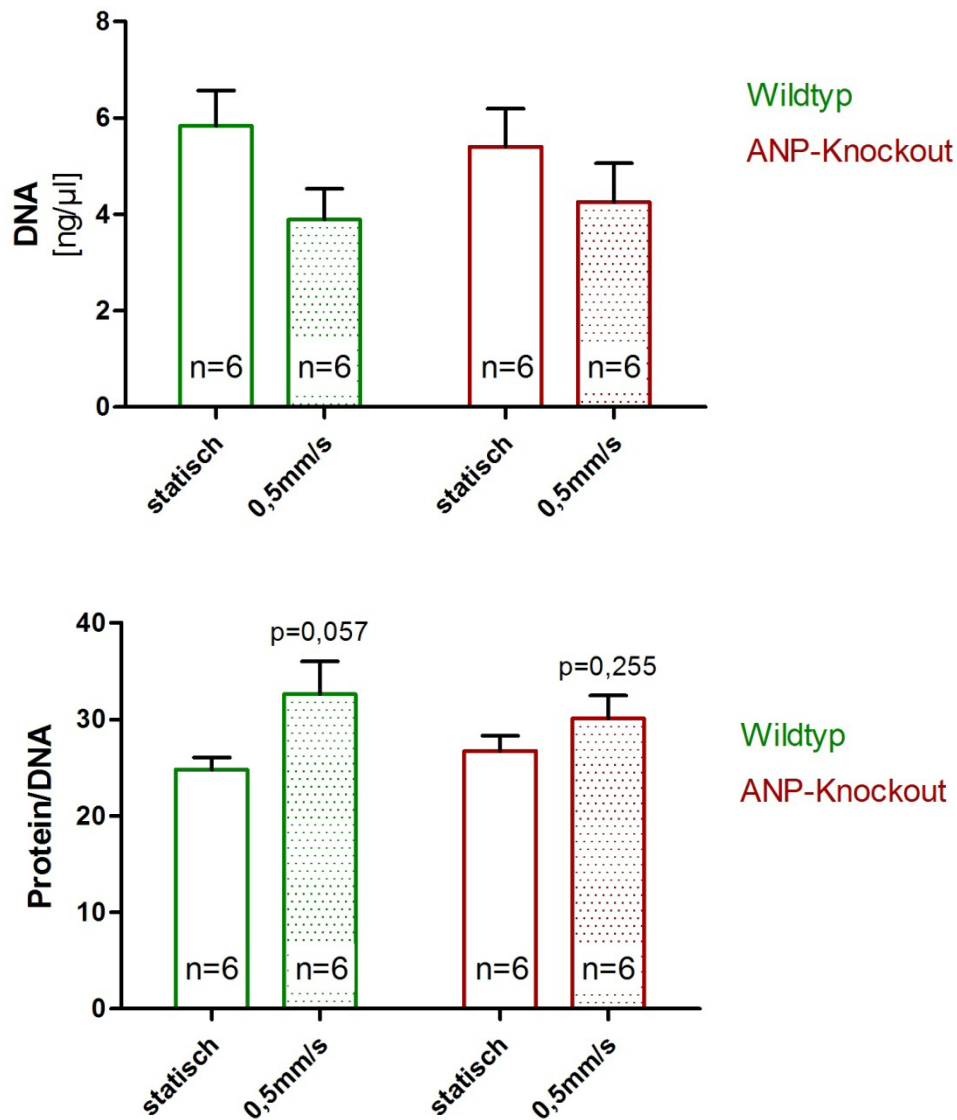


Abb. 3.19: Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein/DNA-Verhältnis von PTC statisch bzw. nach Perfusion (24 h, 0,5 mm/s): Wildtyp-Zellen vs. ANP-Knockout-Zellen

Bei der Auswertung der Protein/DNA-Ratio wurde zusätzlich eine Normierung vorgenommen, um den verfälschenden Einfluss auf das Ergebnis zu umgehen, der durch die Varianz der Ausgangswerte von Versuch zu Versuch bedingt ist. Abb. 3.20 zeigt somit das Protein/DNA-Verhältnis der perfundierten Zellen als Vielfaches der statischen Kontrolle getrennt für Wildtyp- und ANP-KO-Zellen. Nach der „Fehlerkorrektur“ konnte für beide Zelltypen eine signifikante Zunahme der Protein/DNA-Ratio festgestellt werden. Die perfundierten Wildtyp-Zellen wiesen einen Anstieg der Ratio um 30 % gegenüber den Kontrollzellen auf ($p = 0,002$). Durch Perfusion der ANP-KO-Zellen konnte eine Zunahme des Proteingehalts bezogen auf die DNA um 13 % erzielt werden ($p = 0,001$). Beim Vergleich

des Ausmaßes der flussinduzierten Hypertrophie konnte ein signifikanter Unterschied in der Zunahme der Ratio bei Wildtyp-Zellen und ANP-KO-Zellen festgestellt werden ($p < 0,05$).

Relativwerte: Protein/DNA

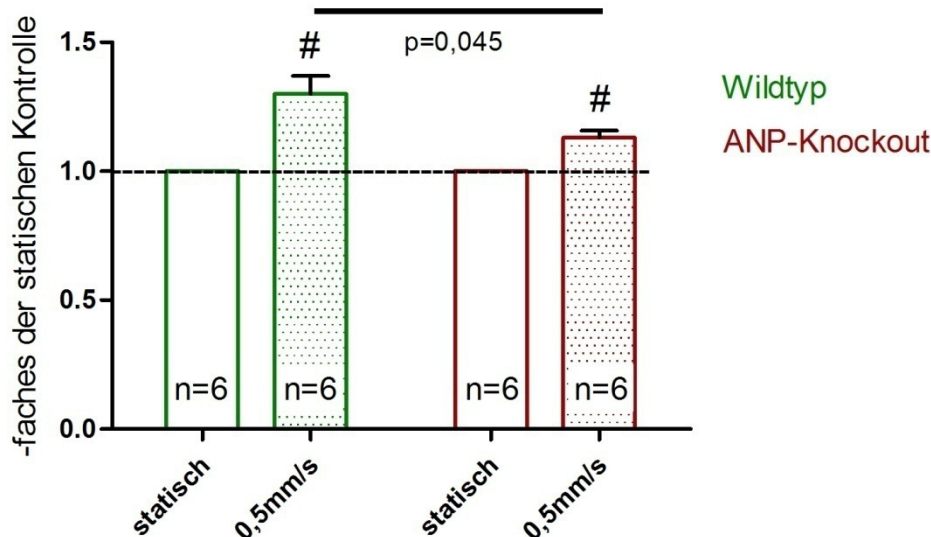


Abb. 3.20: Protein/DNA-Verhältnis von PTC statisch bzw. nach Perfusion (24 h, 0,5 mm/s): Wildtyp-Zellen vs. ANP-Knockout-Zellen
$p < 0,01$ vs. statischer Kontrolle

Aufgrund obiger Daten lässt sich zusammenfassend sagen, dass ANP-KO-Zellen in vitro generell noch in der Lage sind infolge des erhöhten Flusses zu hypertrophieren. Allerdings scheint diese flussinduzierte Hypertrophie unter Abwesenheit von ANP bzw. Urodilatin nur in abgeschwächter Form möglich zu sein. Dafür spricht die im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen signifikant geringere Zunahme der Protein/DNA-Ratio bei den KO-Zellen. Eine lokale ANP- bzw. Urodilatin-Bildung könnte demnach - zumindest in vitro - durchaus eine Rolle bei der Auslösung der flussbedingten Hypertrophie spielen.

3.3 Hypertrophie von ANP-Knockout-Zellen infolge TGF β -Stimulation im Vergleich zu Wildtyp-Zellen

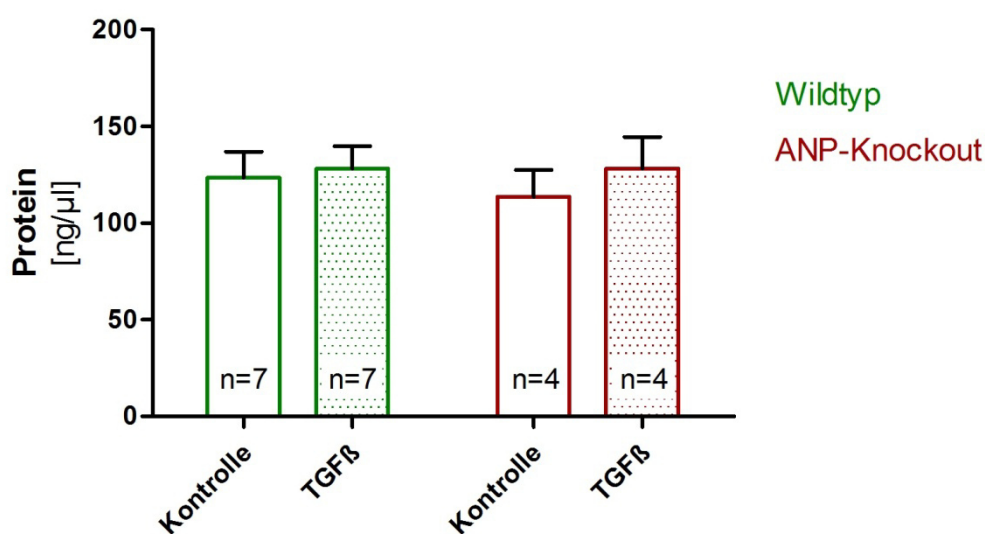
Um nun die abgeschwächte flussinduzierte Hypertrophie der ANP-KO-Zellen tatsächlich als Effekt des ANP-/Urodilatin-Mangels verifizieren zu können, musste die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass ANP-KO-Zellen generell eine eingeschränkte Hypertrophie

zeigen. Dazu wurde als eine Art Positivkontrolle der Transforming Growth Factor TGF β verwendet, dessen hypertrophieauslösende Wirkung auf proximale Tubuluszellen durch Induktion eines Zellzyklusarrests in der späten G₁-Phase allgemein bekannt ist. [2, 6, 7, 9, 23-25]

Konkret wurden die aus Wildtyp- und ANP-KO-Mäusen isolierten primären proximalen Tubuluszellen in 24 Well-Platten kultiviert und nach Erreichen der Konfluenz für 24 Stunden mit TGF β in der bewährten Konzentration von 100 pM stimuliert. Als Bezugsgröße dienten in hormonfreiem Medium inkubierte Kontrollzellen. Nachfolgend wurde die Protein- und DNA-Konzentration der Zellen gemessen und die Rationes berechnet.

Die aus sieben (Wildtyp-Zellen) bzw. vier (ANP-KO-Zellen) Experimenten errechneten Mittelwerte der Protein- und DNA-Konzentration sowie der Protein/DNA-Ratio sind als absolute Werte für Wildtyp- und ANP-KO-Zellen separat in Abb. 3.21 dargestellt. Für beide Zelltypen war als Zeichen der durch TGF β induzierten Hypertrophie eine signifikante Zunahme des Proteingehalts im Verhältnis zur DNA zu erkennen. In der Gruppe der Wildtyp-Zellen war ein Anstieg der Ratio von 26,6 auf 36,2, also um 36,3 % auszumachen ($p = 0,014$), in der Gruppe der ANP-KO-Zellen eine Zunahme von 29,3 auf 44,1, also um 50,8 % ($p = 0,032$).

Absolutwerte:



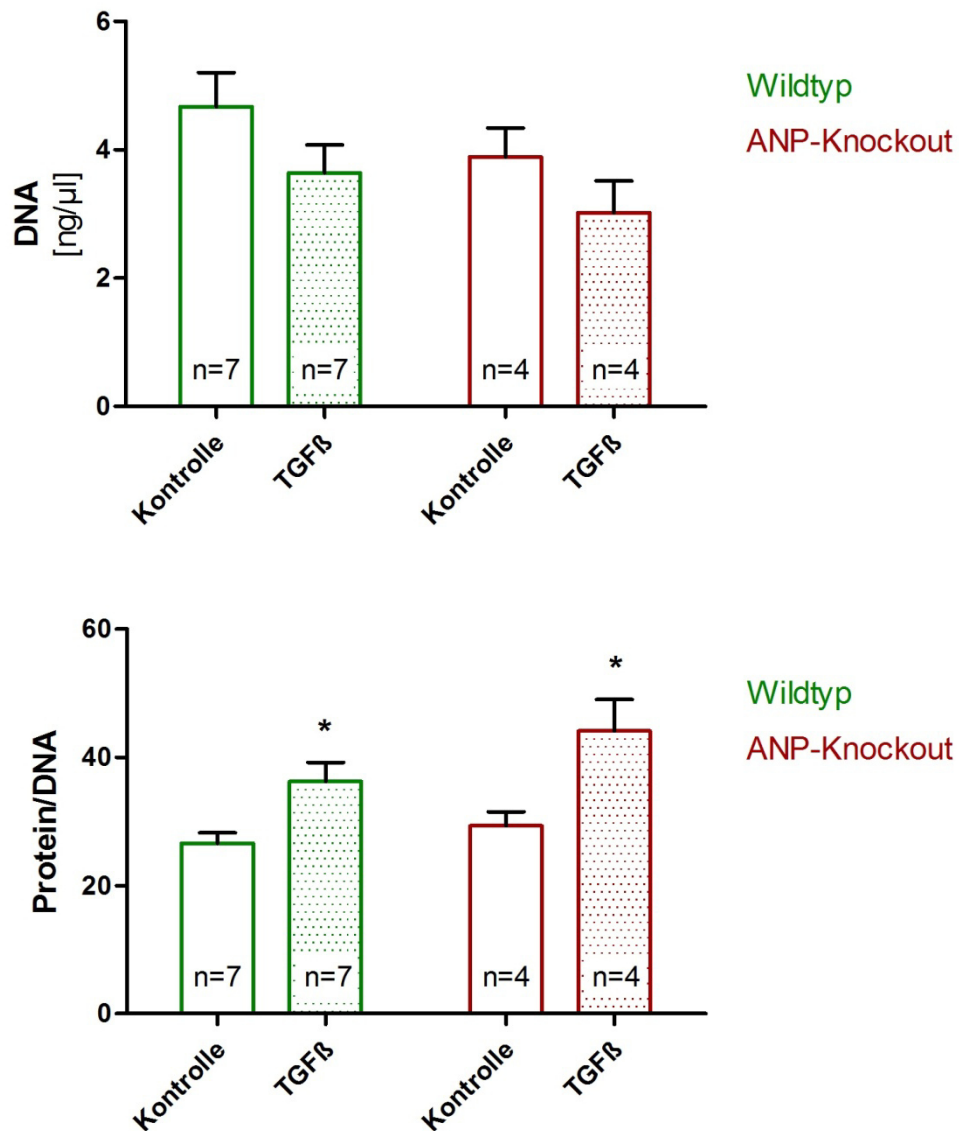


Abb. 3.21: Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein/DNA-Verhältnis von PTC nach Inkubation (24 h) mit TGFβ (100 pM): Wildtyp-Zellen vs. ANP-Knockout-Zellen
* p < 0,05 vs. Kontrollzellen

Abb. 3.22 zeigt ergänzend die Veränderungen der Protein/DNA-Ratio bei TGFβ-Stimulation (100 pM) als Vielfaches des Kontrollwerts, nachdem eine Normierung der Kontrollzellen auf 1,0 durchgeführt wurde. Es konnte für beide Gruppen von Zellen eine signifikante Zunahme der Protein/DNA-Ratio bestätigt werden. Bei den stimulierten Wildtyp-Zellen war das Verhältnis hoch signifikant auf das 1,36fache der Kontrolle gestiegen ($p < 0,001$). Für die ANP-KO-Zellen konnte sogar ein signifikanter Anstieg auf das 1,50fache des Kontrollwerts verzeichnet werden ($p = 0,005$). Ein Vergleich der Ratio-Zunahme der Wildtyp-Zellen und

ANP-KO-Zellen als Maß für die durch TGF β ausgelöste Hypertrophie ergab zudem keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,264$).

Relativwerte:

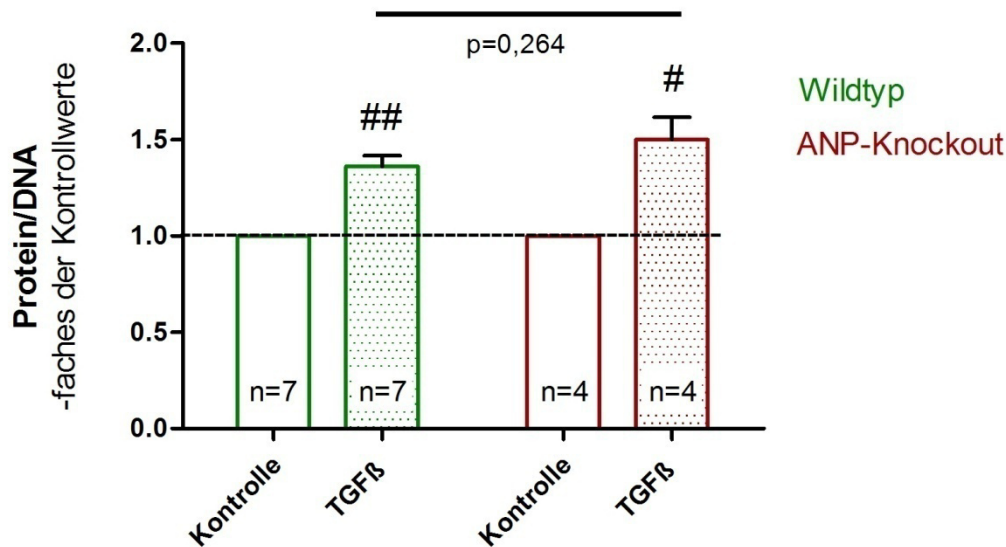


Abb. 3.22: Protein/DNA-Verhältnis von PTC nach Inkubation (24 h) mit TGF β (100 pM): Wildtyp-Zellen vs. ANP-Knockout-Zellen
 # $p < 0,01$ vs. Kontrollzellen
 ## $p < 0,001$ vs. Kontrollzellen

Durch diesen Versuch konnte am Beispiel der TGF β -Stimulation gezeigt werden, dass ANP-KO-Zellen grundsätzlich uneingeschränkt hypertrophieren können und sich dabei nicht von Wildtyp-Zellen unterscheiden. Dieser Befund stellt somit unter Berücksichtigung des vorangehenden Versuchs ein weiteres Indiz dafür dar, dass die parakrine Wirkung von ANP bzw. Urodilatin im Rahmen der flussinduzierten Hypertrophie von Bedeutung ist und das Fehlen dieser NPs eine reduzierte Hypertrophie bei Perfusion bedingt.

3.4 Hypertrophie von ANP-Knockout-Zellen infolge ANP-Stimulation im Vergleich zu Wildtyp-Zellen

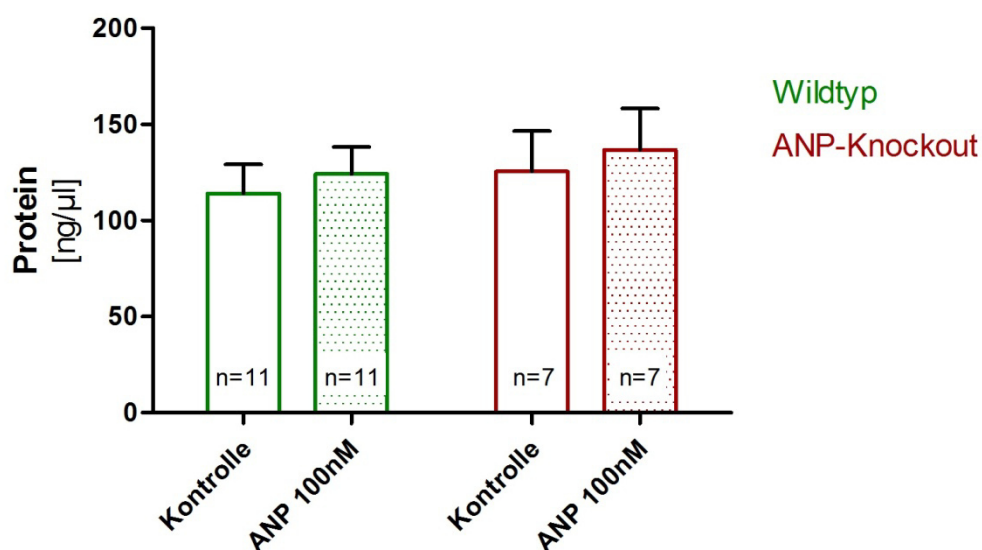
Die Aussage, dass sich ANP-KO-Zellen generell vergleichbar mit Wildtyp-Zellen stimulieren lassen, sollte wie bereits für TGF β gezeigt zusätzlich für eine weitere Substanz belegt werden. Als zweites Beispiel wurde die Behandlung der Zellen mit ANP gewählt. In

Stimulationsversuchen zu Beginn der Arbeit (Abschnitt 1) wurde bereits die direkte hypertrophieauslösende Wirkung des ANP auf PTC von Wildtyp-Mäusen nachgewiesen und die optimale ANP-Konzentration ermittelt. Diese Befunde machte man sich nun zunutze, um das Ansprechen der ANP-KO-Zellen im Vergleich zum Wildtyp zu untersuchen.

Grundsätzlich wurde analog zur TGF β -Stimulation unter 3.3 verfahren. Die aus Wildtyp- und ANP-KO-Mäusen isolierten PTC wurden nun jedoch für 24 Stunden mit 100 nM ANP inkubiert. Im Anschluss folgte wiederum die Bestimmung der Protein- und DNA-Konzentration sowohl der stimulierten Zellen als auch der Kontrollzellen beider Zelltypen.

In Abb. 3.23 sind die absoluten Werte der gemessenen Konzentrationen sowie des Protein/DNA-Verhältnisses vor und nach ANP-Stimulation für Wildtyp-Zellen und ANP-KO-Zellen vergleichend dargestellt. In beiden Gruppen (Wildtyp - ANP-KO) kam es zu einer vermehrten Proteinsynthese ohne nachfolgende Proliferation, was an der Zunahme des Proteingehalts der Zellen bei gleichbleibender bzw. tendentiell abnehmender DNA-Konzentration erkennbar ist. Daraus resultierte jeweils eine Zunahme der Protein/DNA-Ratio als Zeichen der durch ANP induzierten Hypertrophie. Für die Wildtyp-Zellen ergab sich ein signifikanter Anstieg ($p = 0,003$) der Ratio von 24,2 auf 30,2 (um 24,9 %); bei den ANP-KO-Zellen stieg die Ratio von 26,0 auf 30,4 (um 17,0 %).

Absolutwerte:



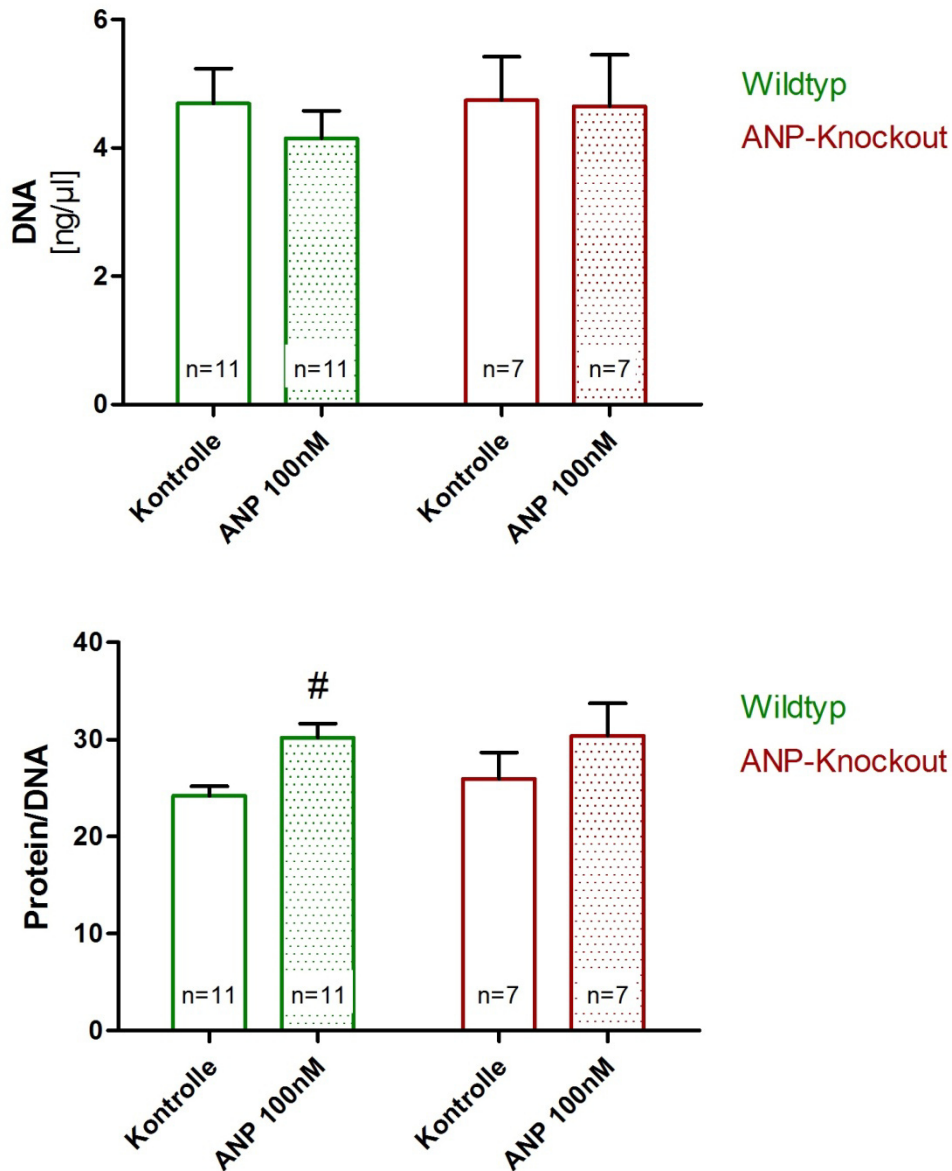


Abb. 3.23: Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein/DNA-Verhältnis von PTC nach Inkubation (24 h) mit ANP (100 nM): Wildtyp-Zellen vs. ANP-Knockout-Zellen
$p < 0,01$ vs. Kontrollzellen

Die Protein/DNA-Ratio nach ANP-Stimulation (100 nM) wird in Abb. 3.24 jeweils für Wildtyp- und ANP-KO-Zellen als Vielfaches des Kontrollwerts veranschaulicht. Daraus geht noch deutlicher der Anstieg des Protein/DNA-Verhältnisses hervor. Die stimulierten Wildtyp-Zellen zeigten eine hoch signifikante Zunahme der Ratio auf das 1,25fache des Kontrollwerts ($p < 0,001$). Bei den ANP-KO-Zellen ergab sich eine signifikante Zunahme auf das 1,19fache der Kontrolle ($p = 0,025$). Ebenso wie bei der TGFβ-Stimulation konnte auch hier beim

Vergleich der Wildtyp- und ANP-KO-Zellen kein signifikanter Unterschied der induzierten Hypertrophie festgestellt werden ($p = 0,467$).

Relativwerte:

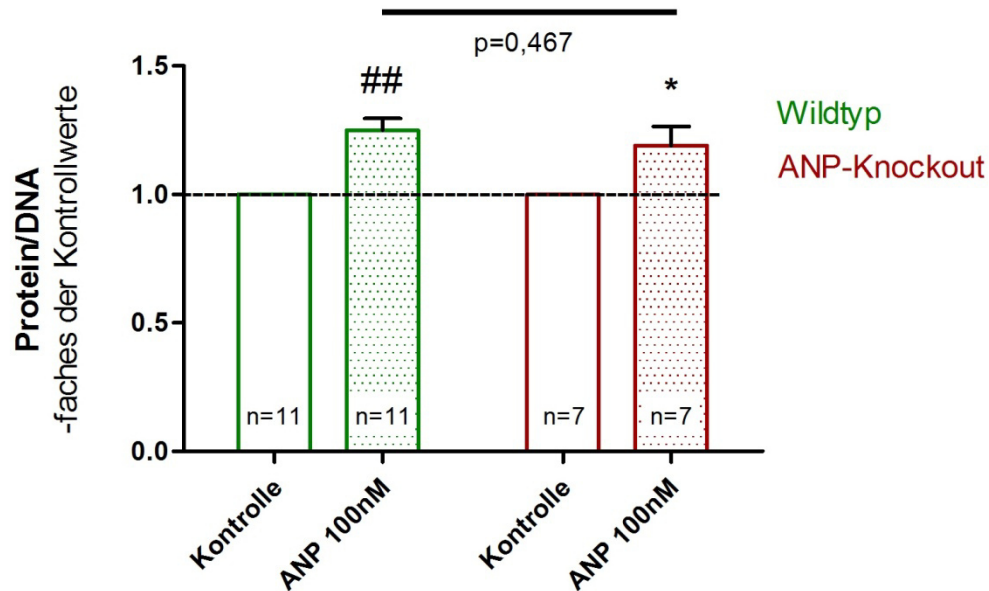


Abb. 3.24: Protein/DNA-Verhältnis von PTC nach Inkubation (24 h) mit ANP (100 nM):

Wildtyp-Zellen vs. ANP-Knockout-Zellen

$p < 0,001$ vs. Kontrollzellen

* $p < 0,05$ vs. Kontrollzellen

Die allgemeine Fähigkeit der ANP-KO-Zellen infolge einer Stimulation durch verschiedene Substanzen unbeeinträchtigt zu hypertrophieren konnte nun auch mit ANP bestätigt werden.

Insgesamt sprechen die Versuchsergebnisse dieses Abschnitts der vorliegenden Arbeit für eine Mitbeteiligung von ANP bzw. Urodilatin als auslösende Faktoren der flussinduzierten Hypertrophie. Die aufgestellte Hypothese einer lokalen ANP- bzw. Urodilatin-Produktion bei Perfusion hat damit durchaus ihre Berechtigung.

4. Nachweis von ANP und BNP bei der flussinduzierten Hypertrophie primärer proximaler Tubuluszellen

Nachdem eine lokale Produktion natriuretischer Peptide infolge des erhöhten Flusses postuliert wurde, war nun der nächste Schritt, das bei Perfusion sezernierte ANP selbst bzw. eine gesteigerte Genexpression nachzuweisen. Außerdem sollte überprüft werden, ob eine lokale BNP-Produktion ebenfalls eine Rolle bei der flussinduzierten Hypertrophie spielen und möglicherweise einen ANP-Verlust ausgleichen könnte. Die Fähigkeit einer Hypertrophie-induktion durch die direkte Wirkung von BNP als Voraussetzung wurde bereits im ersten Abschnitt der Arbeit gezeigt. BNP kam insofern in Frage, weil bei Perfusion der ANP-KO-Zellen eine Resthypertrophie nachweisbar war und darüber hinaus in Vorversuchen mit GC-A-KO-Mäusen eine Beteiligung des natriuretischen Peptidrezeptors A gefunden wurde, der als Liganden sowohl ANP als auch BNP binden kann.

4.1 ANP- bzw. BNP-Messung im Perfusat

Zunächst war das Ziel das bei der Perfusion der Zellen abgegebene ANP bzw. BNP direkt aus der Superfusionsflüssigkeit nachzuweisen. Dazu wurden zum einen primäre proximale Tubuluszellen aus C57BL/6-Mäusen isoliert, wie in obigen Ausführungen beschrieben perfundiert (24 Stunden, 0,5 mm/s) und anschließend das Perfusionsmedium sowie das Medium der statisch inkubierten Kontrollzellen in Eppendorf-Cups überführt. Das gesammelte Medium wurde dann für die Bestimmung der Konzentration von ANP mit Hilfe eines Enzym-Immunoassays eingesetzt. Zum anderen wurden für die BNP-Bestimmung PTC aus ANP-KO-Mäusen und deren Wildtyp-Geschwistern isoliert, perfundiert und die Überstände ebenfalls für die BNP-Konzentrationsbestimmung mittels Enzym-Immunoassay verwendet. Allerdings waren die Konzentrationen von ANP und BNP im Perfusat zu niedrig, sodass sie nicht im verlässlich messbaren Bereich des Enzym-Immunoassay-Kits lagen.

4.2 Perfusionsabhängige Genexpression der natriuretischen Peptide ANP und BNP

Da ein direkter Nachweis von ANP und BNP aufgrund zu geringer Konzentrationen im Perfusat nicht gelang und somit keine Aussagen ermöglichte, wurde nachfolgend versucht, auf mRNA-Ebene Aufschluss zu erhalten.

Primäre proximale Tubuluszellen wurden aus C57BL/6-Mäusen gewonnen, über 24 Stunden mit einer Flussrate von 0,5 mm/s perfundiert und jeweils die Gesamt-RNA pro Well für die perfundierten Zellen wie für die nicht perfundierten Kontrollzellen isoliert. Die daraus erhaltene cDNA konnte nun für die quantitative Echtzeit-PCR (RTqPCR) eingesetzt werden, um die Genexpression von ANP und BNP zu bestimmen.

Die ANP-Expression und damit der mRNA-Gehalt der Zellen stellte sich als sehr niedrig heraus. Durch Ermittlung des crossing points (Cp), der dem messbaren Beginn der exponentiellen Produktzunahme entspricht, ergab sich eine erste Nachweisbarkeit der ANP-Transkripte bei 30 Zyklen. Da der Cp mit der eingesetzten cDNA-Konzentration invers exponentiell zusammenhängt, konnte gefolgert werden, dass in kultivierten Zellen die ANP-Expression mittels RTqPCR nicht reproduzierbar nachgewiesen werden kann.

Des Weiteren wurde die Menge an BNP-mRNA in den perfundierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen bestimmt. Als Bezugsgröße für die Auswertung diene wie schon in anderen Versuchen das Housekeeping-Gen RP L32.

Abb. 3.25 zeigt zunächst die in vier unabhängigen Versuchen gemessenen und gemittelten absoluten mRNA-Konzentrationen von BNP und RP L32 in PTC jeweils mit und ohne Perfusion. Für das ribosomale Protein L32 konnte bestätigt werden, dass das Gen im verwendeten Modell nicht reguliert ist; die mRNA-Konzentration der Zellen blieb bei Perfusion konstant ($p = 0,853$). Dagegen zeigte sich beim BNP eine signifikante Zunahme ($p = 0,004$) der BNP-Transkripte als Folge der Superfusion um 66,1 % verglichen mit den Kontrollzellen.

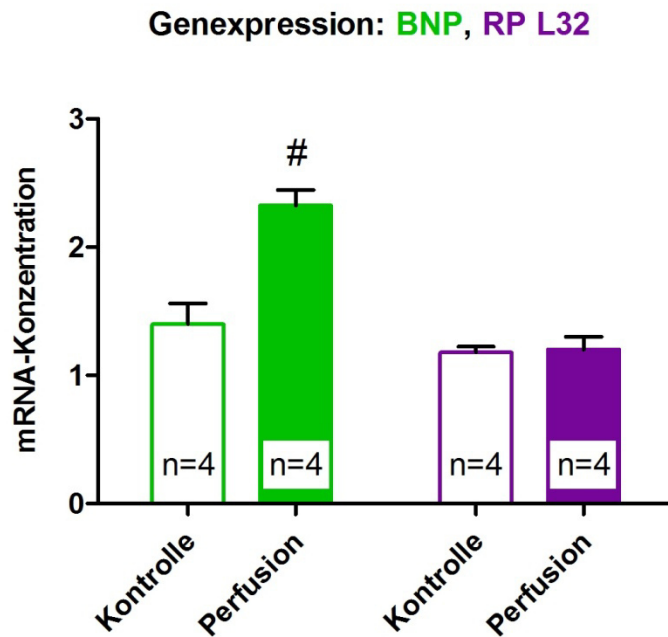


Abb. 3.25: Renale BNP- und RP L32-Expression in primären proximalen Tubuluszellen: perfundierte PTC (24 h, 0,5 mm/s) vs. Kontrollzellen (Bestimmung der Genexpression mittels RTqPCR)
$p < 0,01$ vs. Kontrollzellen

Darüber hinaus wurden die Werte der renalen BNP-Expression jeweils auf die entsprechende Expression von RP L32 bezogen und die erhaltenen Ergebnisse in Abb. 3.26 veranschaulicht. Augenscheinlich unterliegt BNP im Zusammenhang mit der Perfusion einer Regulation. Das Verhältnis BNP/RP L32 nahm bei den superfundierten Wildtyp-Zellen signifikant ($p = 0,038$) von 1,19 bei den Kontrollzellen auf 2,00 zu. Dies entspricht einer Zunahme von 68,3 % des Vergleichswerts.

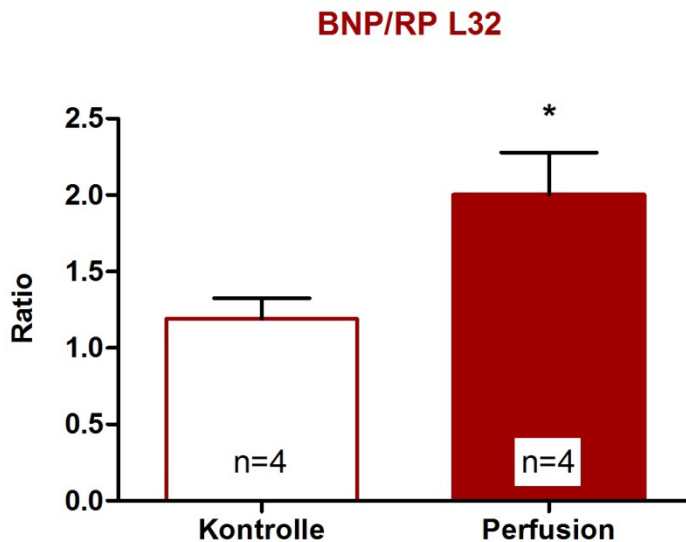


Abb. 3.26: Renale BNP-Expression in primären proximalen Tubuluszellen bezogen auf RP L32-Expression: perfundierte PTC (24 h, 0,5 mm/s) vs. Kontrollzellen (Bestimmung der Genexpression mittels RTqPCR)
* $p < 0,05$ vs. Kontrollzellen

Auch auf mRNA-Ebene konnte die erwartete vermehrte Transkription des ANP-Gens aufgrund zu geringer mRNA-Konzentrationen nicht verlässlich nachgewiesen werden, sodass keine weitere Bestätigung der Hypothese einer lokalen ANP-Produktion infolge Perfusion erbracht werden konnte. Dennoch bleibt zu vermuten, dass ANP in vitro zumindest die Rolle eines Cofaktors bei der Induktion der flussabhängigen Hypertrophie einnimmt.

Im Falle von BNP gelang es mithilfe der RTqPCR die gesteigerte Expression des BNP-Gens in den perfundierten proximalen Tubuluszellen zu erfassen. Dieser Befund ist auch im Hinblick auf bereits beschriebene Versuchsergebnisse stimmig: So bewirkt die verminderte Expression des NPR-C und der NEP ebenso eine erhöhte Konzentration der natriuretischen Peptide wie die Aktivierung des BNP-Gens. Beide Mechanismen zur Regulation der Menge natriuretischer Peptide wirken somit gleichsinnig. Dieser Versuch deutet insgesamt auf eine durch die Superfusion bedingte lokale Bildung von BNP mit darauf folgender Hypertrophie der PTC hin. Möglicherweise kann der ANP-Verlust bei Perfusion von ANP-KO-Zellen durch BNP teilweise ausgeglichen werden, sodass die Hypertrophie nicht vollständig ausbleibt. In diesem Bereich sind allerdings weitere Experimente mit BNP-KO-Mäusen notwendig.

IV. Diskussion

Die kompensatorische renale Hypertrophie ist ein schon sehr lange bekanntes Phänomen, bei dem als Folge des Verlusts von funktionstüchtigem Nierengewebe sowohl funktionelle als auch strukturelle Veränderungen im Bereich des noch verbliebenen Gewebes in Erscheinung treten. [49, 270] Trotz zahlreicher Studien auf diesem Gebiet blieben grundlegende Fragen zu den dabei beteiligten Mechanismen bislang unklar. Von großer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die äußerst populäre sog. „workload“-Hypothese der renalen Hypertrophie, gemäß der die glomeruläre Hyperfiltration und die damit verbundene verstärkte tubuläre Beladung einen entscheidenden Faktor für die Tubulushypertrophie darstellt. [166, 167] Gestützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass eine Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate im Rahmen des kompensatorischen Nierenwachstums bei diversen Auslösern als gemeinsame Folge auftritt. [45, 49] Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die funktionelle Anpassung den strukturellen Veränderungen zeitlich voraus geht. [1, 49, 162] Die Mechanismen, über die ein derartig gesteigerter tubulärer Fluss die Hypertrophie zu induzieren vermag, konnten bislang allerdings noch nicht ausreichend aufgeklärt werden. Vorausgehende Versuche unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass bei GC-A-KO-Mäusen, die einer Uninephrektomie unterzogen worden waren, im Gegensatz zu Wildtypmäusen keine signifikante Hypertrophie der proximalen Tubuli auftrat. Auch in vitro konnte bei primären proximalen Tubuluszellen (PTC) von GC-A-KO-Mäusen durch Imitation der tubulären Mehrbeladung im Superfusionsmodell keine Hypertrophie ausgelöst werden. [179] Darüber hinaus finden sich in der Literatur Hinweise auf die Existenz eines lokalen Faktors, der möglicherweise eine Verbindung zwischen der Hyperfiltration und der Hypertrophie bedingen könnte. [49] Basierend auf diesen Vorbefunden wurde schließlich die Hypothese aufgestellt, dass eine lokale Produktion natriuretischer Peptide - induziert durch die Mehrbeladung des proximalen Tubulus - und deren autokrine Wirkung an der Entwicklung der Hypertrophie der proximalen Tubuluszellen beteiligt ist. Insbesondere ANP und Urodilatin waren hier aufgrund der allgemein bekannten renalen Bildung in Erwägung zu ziehen (siehe I., 3.3). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Prüfung der genannten These grundsätzlich auf in vitro-Untersuchungen unter entsprechend kontrollierten Bedingungen zurückgegriffen.

1. Die natriuretischen Peptide ANP und BNP lösen eine Hypertrophie primärer proximaler Tubuluszellen der Maus aus

Im ersten Abschnitt meiner Arbeit konnte anhand von Stimulationsversuchen eine konzentrationsabhängige Hypertrophie durch direkte ANP- sowie BNP-Einwirkung bei primären proximalen Tubuluszellen der Maus nachgewiesen werden, sodass die grundlegende Voraussetzung für die bereits formulierte Hypothese einer auto- bzw. parakrinen Wirkung der NPs erfüllt ist. Als Maß für die induzierte Hypertrophie diente dabei die Zunahme des Protein/DNA-Quotienten. Während bei einer Zellhypertrophie nämlich der DNA-Gehalt der Zellen weitgehend unverändert bleibt, kommt es zu einer gesteigerten Proteinkonzentration und somit zu einer Zunahme der Zellgröße bei konstanter Zellzahl. [1] Im Fall von ANP wurde der maximale Effekt bei Inkubation der PTC mit einer Konzentration von 100 nM über 24 h ermittelt. Die stimulierten Zellen wiesen dabei eine signifikante Zunahme des Protein/DNA-Verhältnisses um bis zu 44 % auf (Abb. 3.2 dritter Graph). Auch die Stimulation der PTC mit BNP bestätigte dessen hypertrophierenden Effekt mit einem Maximum bei einer Konzentration von 100 nM. Als Ausdruck der Hypertrophie stieg die Protein/DNA-Ratio innerhalb von 24 h ebenfalls signifikant um bis zu 50 % an (Abb. 3.4 dritter Graph).

Neben zahlreichen physiologischen wie auch pathophysiologischen Wirkungen der natriuretischen Peptide unter anderem im Bereich des Wasser- und Elektrolythaushalts sowie der Blutdruckeinstellung wird seinen Vertretern ANP und BNP insbesondere auch eine Bedeutung in der Regulation des Zellwachstums zugeschrieben. [158, 263] Die in der Literatur zu diesem Thema veröffentlichten Ergebnisse erweisen sich dabei jedoch zum Teil als sehr widersprüchlich.

Ein Großteil der in vitro-Studien, die zur Aufklärung der Rolle von ANP im Kontext von Wachstum und Proliferation durchgeführt wurden, bestätigen einen antiproliferativen Effekt für eine Vielzahl von Zelltypen und stehen somit im Einklang mit den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen. So konnte García-Ocaña und seine Kollegen [271] an proximalen Tubuluszellen der Kaninchenniere einen dosisabhängigen antimitogenen Einfluss von ANP nach 48 h Inkubation feststellen, welcher sich in einem verminderten Einbau von [³H]Thymidin in die DNA ausdrückte. Unter den Versuchsansätzen mit 1 nM, 10 nM bzw. 100 nM ANP stellte sich der maximale Effekt analog zu meinen Daten bei einer Konzentration von 100 nM ein. Auch in vitro-Untersuchungen an mesangialen Zellen aus Glomeruli der Ratte untermauern die antiproliferative bzw. hypertrophierende Wirkung von

ANP. [263] Neben einer Abnahme der Inkorporation von [^3H]Thymidin in die DNA um etwa 50 % kam es infolge der Stimulation mit ANP zusätzlich zu einer Abnahme der Zellzahl um 33 %. Diese inhibitorischen Eigenschaften von ANP auf die Mitogenese zeigten auch bei mesangialen Zellen eine Konzentrationsabhängigkeit, wobei sich bereits unter physiologischen Konzentrationen die Wirkung entfaltete. [272, 273] Des Weiteren wurde auch bei glatten Gefäßmuskelzellen von einem antiproliferativen Einfluss des ANP berichtet. [274, 275, 277] Kultivierte Gefäßmuskelzellen der Ratte, die zunächst mittels PDGF stimuliert worden waren, ergaben ebenfalls eine Konzentrationsabhängigkeit der durch ANP induzierten Proliferationshemmung. Die erforderlichen Mengen an ANP lagen dabei im pharmakologischen Bereich. Beispielsweise verminderten 100 nM und 1 μM ANP die Mitogenese um 25 % und 59 %. [275] ANP inhibiert auch die Mitogenese in Endothelzellen aus der Aorta des Rindes wie Itoh et al. 1992 anhand von in vitro-Untersuchungen demonstrierten. 100 nM und 1 μM ANP verminderten die DNA-Synthese der Zellen signifikant, während niedrigere Konzentrationen keine derartigen Effekte herbeiführten. [262] Darüber hinaus unterstützen auch Befunde aus Versuchen an kardialen Fibroblasten [261] sowie Gliazellen [278] der Ratte das Phänomen der Proliferationshemmung infolge einer ANP-Einwirkung.

Allerdings finden sich in der Literatur auch gegensätzliche Ergebnisse. Beispielsweise konnte in Studien an Zellen des Mesangiums aus der Ratte, welche gegenüber Arginin Vasopressin als mitogenem Stimulus exponiert waren, keinerlei Wirkung des ANP im Sinne einer Hemmung der DNA-Synthese festgestellt werden. [279] Neben dem bereits beschriebenen antiproliferativen Effekt von ANP in der Zellkultur glatter Gefäßmuskelzellen konnte zusätzlich eine Hemmung der Protein- und RNA-Synthese als Ausdruck einer antihypertrophen Wirkung nachgewiesen werden. [280] Im Gegensatz zu den angeführten Beispielen, die eine Proliferationshemmung belegen, kann ANP allerdings die Zellteilung sogar stimulieren, wie es etwa für humane Lymphozyten gezeigt werden konnte. [281]

Ein Erklärungsansatz für diese zum Teil sehr konträren Ergebnisse besteht in der Tatsache, dass Peptidwachstumsfaktoren häufig multifunktionell sind. ANP als ein Vertreter kann somit in Abhängigkeit vom Umfeld und den Gegebenheiten sowohl mitogen als auch antimitogen wirken. Als wichtige Einflussfaktoren, die den Kontext bestimmen, sind dabei vor allem die Zellkulturbedingungen, die Konzentration des Agens sowie die An- oder Abwesenheit anderer Wachstumsfaktoren zu nennen. Weiterhin kann die Expression von Rezeptoren ebenso wie der Differenzierungszustand der Zellen von Bedeutung sein. [263, 282]

Die Konzentrationsabhängigkeit der durch ANP induzierten antiproliferativen bzw. hypertrophierenden Effekte - wie sie sich in meinen Versuchen darstellte - wird durch diverse Studien an verschiedenen Zelltypen gestützt. [271, 272, 275] Allerdings trat die besagte Wirkung häufig erst bei höheren ANP-Konzentrationen, d.h. im pharmakologischen Bereich auf. Dabei lag die benötigte Konzentration, um signifikante bzw. maximale Effekte zu erzielen, meist um etwa 100 nM und höher. [261, 262, 271] In kultivierten und mittels Concanavalin A stimulierten Thymozyten reichte analog zu meinen Daten bereits 1 nM ANP aus, um die Proliferation signifikant zu blockieren. [276] Die Beobachtung, dass häufig ANP-Mengen außerhalb des physiologischen Bereichs von etwa 10^{-9} M bis 10^{-11} M erforderlich sind, passt durchaus zu der Theorie einer lokalen Produktion der NPs und direkten Wirkung am proximalen Tubulus, da auf diese Weise am Wirkort selbst höhere Konzentrationen erreicht werden können als dies bei einer systemischen Wirkung im Plasma der Fall ist. [263] Damit im Einklang steht weiterhin auch die von Dr. Andrea Schreiber beschriebene nachrangige Bedeutung von ANP in Bezug auf seine indirekte Wirkung an der Niere im Rahmen der kompensatorischen Hypertrophie. [179]

Im Vergleich zu ANP scheint die Bedeutung von BNP im Zusammenhang mit der Regulation von Zellwachstum - insbesondere auch die Niere betreffend - deutlich weniger erforscht zu sein. Aufgrund einiger Studien konnten allerdings auch für BNP in verschiedenen Zellmodellen antiproliferative Eigenschaften gezeigt werden. Sowohl in der Primärkultur kardialer Fibroblasten aus neugeborenen Ratten als auch an kultivierten Gliazellen der Ratte wurde eine Hemmung der DNA-Synthese und damit der Mitogenese festgestellt. [261, 278] Bei BNP-KO-Mäusen treten daher im Umkehrschluss die kardialen Auswirkungen phänotypisch in Form einer ventrikulären Fibrose in Erscheinung. [260] Darüber hinaus bestätigten in vitro erhobene Befunde an humanen ebenso wie aus Ratten gewonnenen glatten Gefäßmuskelzellen die Inhibition der Proliferation durch BNP über den cGMP-Signalweg. [283, 284] Gao und seine Kollegen beschrieben 2009 für die geschilderte BNP-Wirkung an Angiotensin II-stimulierten Gefäßmuskelzellen von Ratten eine Konzentrationsabhängigkeit, wobei in einem Bereich von 1 nM bis 1 μ M BNP Signifikanz der Daten festgestellt wurde. Niedrigere Dosen waren dagegen nicht imstande derartige Effekte auszulösen. Das Wirkmaximum wurde zudem bei 100 nM BNP beobachtet, während höhere Konzentrationen keine weitere Steigerung der Wirkung bedingten. [283] Passend dazu zeigten sich die in verschiedenen Studien erzielten BNP-Effekte meist bei Inkubation mit einer Konzentration von 100 nM. [261, 284] Somit sind meine Ergebnisse zur Dosis-Wirkungs-Beziehung

zwischen BNP und seiner Proliferationshemmung mit den hier dargestellten Befunden aus der Literatur durchaus stimmig.

Ähnlich wie beim ANP ist auch bei BNP der Einsatz relativ hoher, weit über dem physiologischen Niveau liegender Konzentrationen nötig, um eine biologische Wirkung auszulösen. Dabei macht die normale Plasmakonzentration von BNP beim gesunden Menschen sogar nur ein Zehntel der ANP-Konzentration aus. [13] Denkbar wäre, dass zwar in vivo eine wesentlich geringere Plasmakonzentration und damit systemisch wirksames BNP zu messen ist als in den in vitro-Versuchen verwendet, jedoch lokal entsprechend hohe BNP-Spiegel erreicht werden können und somit eine Hypertrophie induzieren. Als zugrunde liegender Mechanismus käme eine verstärkte Expression des BNP-Gens am Wirkort selbst, also zum Beispiel in den Zellen des proximalen Tubulus, oder ein verminderter Abbau etwa durch Hemmung der NEP in Frage. In diesem Kontext ist die Überlegung bezüglich einer autokrinen Wirkung natriuretischer Peptide auf die Niere trotz der in vitro relativ hohen erforderlichen BNP-Konzentrationen durchaus plausibel.

Darüber hinaus gibt es Berichte, die BNP als das biologisch am stärksten wirksame NP bezeichnen, insbesondere im Hinblick auf seine renalen Effekte. [285] Die Tatsache, dass BNP verglichen mit ANP eine 10mal längere HWZ aufweist, dürfte mit für diese starke Wirkung verantwortlich sein und möglicherweise auch die physiologisch höhere ANP-Plasmakonzentration ausgleichen. [13]

Hinsichtlich der Vergleichbarkeit der in dieser Arbeit erhobenen Befunde zur Hypertrophieinduktion durch ANP bzw. BNP in der Primärkultur proximaler Tubuluszellen und den angeführten Studien muss die Tatsache berücksichtigt werden, dass die Daten aus der Literatur unter zum Teil sehr unterschiedlichen Bedingungen erhoben wurden. In einigen Studien behandelte man die Zellen vor der ANP- bzw. BNP-Inkubation mit verschiedenen Agentien, die einen mitogenen Reiz vermitteln sollten. Verwendung fanden zu diesem Zweck beispielsweise Substanzen wie PDGF, Arginin Vasopressin, Concanavalin A, Angiotensin II oder EGF. [180, 271, 275, 276, 279, 283] Im Gegensatz dazu erfolgten die Versuche mit PTC in dieser Arbeit ohne Einsatz derartiger Wachstumsfaktoren.

Letztlich konnte anhand des verwendeten in vitro-Modells gezeigt werden, dass sowohl ANP als auch BNP in der Primärkultur renaler proximaler Tubuluszellen aus der Maus über direkte antiproliferative, hypertrophieinduzierende Eigenschaften verfügt und damit die Grundvoraussetzung für die aufgestellte Hypothese gegeben ist.

2. Gültigkeit der „workload“-Hypothese im verwendeten in vitro-Zellmodell

In den nachfolgenden Versuchen galt es nun, als weitere Voraussetzung zunächst die Gültigkeit der sog. „workload“-Hypothese für das verwendete in vitro-Zellmodell - wie bereits von Dr. Andrea Schreiber beschrieben - zu bestätigen. Diese These sieht in der erhöhten glomerulären Filtration und der damit verbundenen erhöhten tubulären Flussrate den initialen Stimulus für die Induktion der Hypertrophie der proximalen Tubuli. [1, 49, 61, 88, 165, 293] Um die Hyperfiltration und dadurch bedingte tubuläre Mehrbelastung in vitro möglichst realistisch imitieren zu können, wurde ein spezielles Superfusionsmodell entwickelt (siehe II., 3.1). Mit Hilfe dieses in vitro-Systems konnten sowohl isolierte PTC der Maus als auch LLC-PK₁-Zellen bei unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten mit serum- und hormonfreiem Medium superfundiert werden. Nach Perfusion der PTC (Wildtyp) für 24 h mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 0,5 mm/s zeigte sich die Hypertrophie als signifikante Zunahme des Protein/DNA-Quotienten um 30 % gegenüber den Kontrollzellen (Abb. 3.6). Analog dazu kam es auch bei den LLC-PK₁-Zellen innerhalb von 24 h durch Superfusion mit 1 mm/s zu einer ausgeprägten flussinduzierten Hypertrophie mit ebenfalls signifikantem Anstieg des Protein/DNA-Verhältnisses um 82 % (Abb. 3.8). Die Tatsache, dass in beiden Zellmodellen infolge der Perfusion in ähnlicher Weise eine Zunahme der Zellgröße resultierte, spricht letztlich für ein bei proximalen Tubuluszellen allgemeingültiges Phänomen. Augenscheinlich ist die im Vergleich deutlich stärkere Hypertrophie der LLC-PK₁-Zellen. Dabei sind verschiedene Aspekte zu berücksichtigen: Zum einen wurde bei der porcinen Zelllinie die Superfusion mit einer höheren Geschwindigkeit von 1 mm/s durchgeführt, bei welcher in Untersuchungen von Dr. Andrea Schreiber zur Flussabhängigkeit das Maximum der Hypertrophie sowohl in der Primärkultur als auch mit den LLC-PK₁-Zellen erzielt wurde. Zum anderen kann bei primären Zellen anders als bei einer Zelllinie nicht von einer stets 100%igen Reinheit der Kultur ausgegangen werden. Da allerdings die flussbedingte Hypertrophie hauptsächlich den proximalen Tubulus betrifft [1], ist anzunehmen, dass bei entsprechender Homogenität der Primärkultur eine noch deutlichere Zunahme zu erwarten wäre. Nicht zu vergessen ist schließlich aber auch die Tatsache, dass es sich bei den LLC-PK₁-Zellen um eine immortalisierte Zelllinie, also Tumorzellen mit einer naturgemäß hohen Proliferationsrate, handelt. Ein Proliferationsstopp führt demnach zu einer ebenso ausgeprägten Hypertrophie.

Die relative Zunahme der Proteinkonzentration bei weitgehend unverändertem DNA-Gehalt der Zellen verbunden mit einer Zunahme des Zellvolumens definiert den Prozess der

Hypertrophie. [1] Zu befürchten wäre eine Verfälschung der Messung beispielsweise durch eine verstärkte Synthese extrazellulärer Matrix infolge der mechanischen Reizung bei der Superfusion der Zellen. [290, 291] Diese Möglichkeit falsch hoher Werte bei der Proteinbestimmung konnte jedoch in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe durch zusätzliche Bestimmung der Zellzahl pro Fläche bzw. des Zellvolumens und der Zellfläche bereits ausgeschlossen werden. [179, 292]

Gemäß der Forschergruppe um Peti-Peterdi [5], die unter Verwendung der Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie basale Funktionsparameter der Niere, unter anderem den tubulären Fluss, bestimmen konnte, liegen die eingestellten Flussgeschwindigkeiten von 0,5 mm/s bzw. 1 mm/s im physiologischen Bereich. Für alle Perfusionsversuche mit PTC der Maus wurde auch im Folgenden stets die bewährte Flussgeschwindigkeit von 0,5 mm/s eingestellt, nachdem in Vorversuchen bei einer höheren Flussrate gehäuft Zellschäden auftraten.

Die „workload“-Hypothese hatte sich damit zumindest in vitro als zutreffend erwiesen, sodass dieses Zellmodell zur weiteren Erforschung der Mechanismen, über die ein Anstieg der GFR in vivo eine Tubulushypertrophie vermitteln könnte, geeignet erschien.

3. Charakterisierung des verwendeten in vitro-Zellmodells

Zur Etablierung des entwickelten Modells der primären proximalen Tubuluszellen der Maus wurde nun neben der rein morphologischen Beurteilung von Zellwachstum und -proliferation die flussabhängige Expression verschiedener bei der kompensatorischen renalen Hypertrophie in vivo bekanntermaßen beteiligter Gene untersucht. Dazu erfolgte zunächst die Perfusion von primär isolierten proximalen Tubuluszellen (Wildtyp) wie unter II. 3.2 beschrieben für 24 h mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 mm/s. Letztlich konnte unter Einsatz der quantitativen Echtzeit-PCR (RTqPCR) die Konzentration der transkribierten mRNA für das entsprechende Gen jeweils in den superfundierten wie in den statisch inkubierten Kontrollzellen bestimmt werden.

3.1 Housekeeping-Gene

Die quantitative real-time PCR stellt derzeit die Methode der Wahl dar, um die mRNA-Konzentrationen spezifischer Gene sowie Veränderungen in deren Expression in biologischen Proben präzise und reproduzierbar nachzuweisen. Jedoch hängt die Aussagekraft der Ergebnisse vom Einsatz geeigneter Normierungsmethoden ab. Diese sind als Fehlerkorrektur nötig, um beispielsweise geringfügige Abweichungen in der Quantität der initial eingesetzten Proben, in der Probenpräparation oder der Effizienz bei der cDNA-Synthese auszugleichen. In diesem Zusammenhang gibt es mehrere Ansätze, die sich gegenseitig nicht ausschließen und an verschiedenen Stellen des Versuchsprotokolls eingebaut werden können. Eine weit verbreitete Möglichkeit diesbezüglich besteht in der Normierung der festgestellten mRNA-Konzentrationen einzelner Gene mit Hilfe sog. Housekeeping-Gene oder Referenzgene. [297] Definitionsgemäß wird für Housekeeping-Gene vorausgesetzt, dass sie im untersuchten Gewebe konstitutiv exprimiert werden und konstante mRNA-Konzentrationen aufweisen unabhängig von den experimentellen Bedingungen bzw. vom Vorliegen verschiedener Versuchsansätze. Da diese Bezugsgene somit quasi keiner Regulation unterliegen, können sie als interne Standards herangezogen werden, um die Genexpression in unterschiedlichen Proben vergleichbar zu machen. [294] Aus der Literatur lässt sich allerdings schließen, dass die gewöhnlich verwendeten Housekeeping-Gene nicht in jedem Gewebe und unter allen Umständen die geforderten Eigenschaften erfüllen. Es existieren demnach keine allgemeingültigen Referenzgene. [294, 300] Vielmehr müssen die jeweils für das verwendete Modell als Bezugsgröße optimal geeigneten Housekeeping-Gene individuell verifiziert werden. [297, 299, 302] Diese Tatsache spiegelt sich auch in den zahlreichen Studien wider, die sich mit eben dieser Problematik befassen und für konkrete Untersuchungen die am besten geeigneten Referenzgene ermitteln. [295, 296, 298, 299, 300, 301] Schließlich bestätigen auch meine im Folgenden angeführten Ergebnisse die Bedeutung der Wahl des passenden Bezugsgens als interne Kontrolle. Als typische Beispiele für die am häufigsten gebrauchten Referenzgene sind unter zahlreichen anderen zu nennen: β -Aktin, RP L32, GAPDH, HPRT, Tubuline sowie 18S und 28S rRNA. [294, 297]

In der vorliegenden Arbeit wurde die renale Expression der beiden Housekeeping-Gene β -Aktin sowie RP L32 in PTC mit bzw. ohne Superfusion untersucht. Entgegen der Erwartung zeigte sich bei β -Aktin als Strukturprotein des Cytoskeletts im Rahmen des kompensatorischen Wachstums eine Regulation. Bei den perfundierten Zellen war dabei eine deutliche Abnahme der mRNA-Konzentration auf 76 % der Kontrollzellen zu verzeichnen

(Abb. 3.9). Essig und Friedlander wiesen in Studien an renalen proximalen Tubuluszellen sowohl in vitro als auch in vivo nach, dass der mechanische Reiz, der durch den verstärkten Fluss ausgeübt wird, eine Umstrukturierung des Cytoskeletts nach sich zieht. Dabei besteht die Vermutung, es handle sich hierbei um keinen generellen Effekt durch die Scherkräfte, sondern hänge vielmehr mit der Funktion der Epithelzellen zusammen. [290] Im vorliegenden Modell scheint die beschriebene flussinduzierte Umgestaltung der Anordnung der Aktin-Filamente mit einem verminderten Bedarf und entsprechend einer reduzierten Genexpression von β -Aktin verknüpft zu sein.

Während β -Aktin im verwendeten Zellmodell somit nicht als Housekeeping-Gen geeignet war, erfüllte L32, ein Vertreter der ribosomalen Proteine, die erforderliche Stabilität der Genexpression. Der mRNA-Gehalt und damit die Genexpression blieben auch nach der Perfusion konstant auf demselben Niveau wie die Kontrollzellen (Abb. 3.9). Nachdem die tubuläre Hypertrophie definitionsgemäß mit einer Zunahme des Proteingehalts der Zellen einhergeht, erscheint es zunächst wenig plausibel, dass sich die Expression des ribosomalen Proteins L32, einer Komponente der 60S-Untereinheit eukaryontischer Ribosomen, durch die Perfusion derart unbeeinflusst zeigt. [33] Neben einer Zunahme der Ribosomenzahl könnte allerdings auch eine gesteigerte Syntheseleistung der bereits im Cytoplasma vorhandenen Ribosomen bzw. eine verminderte Proteindegradierung die erhöhte Proteinkonzentration bedingen. Die beiden letzteren Mechanismen dürften somit in diesem Modell dominieren.

Aufgrund der Tatsache, dass das RP L32-Gen im verwendeten Zellmodell keiner Regulation unterliegt, wurde es als Housekeeping-Gen für alle weiteren untersuchten regulierten Gene als Bezugsgröße verwendet.

3.2 Zellzyklus und Hypertrophie

Unter Berücksichtigung der Bedeutung des Zellzyklus im Rahmen der renalen tubulären Hypertrophie - es kommt zu einem Arrest in der späten G_1 -Phase - erschien es sinnvoll die Regulation der hieran entscheidend beteiligten Cyclin-abhängigen Kinasen CDK2 bzw. CDK4 im Hinblick auf die Charakterisierung des verwendeten Zellmodells genauer zu beleuchten. [7, 9, 25, 48, 81, 123, 128, 312]

Bei der Steuerung der Zellzyklusphasen ist das Zusammenspiel verschiedener Cycline und Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs) von zentraler Bedeutung, wobei für die Einleitung der einzelnen Schritte stets der jeweils dafür spezifische Komplex bestehend aus diesen beiden Komponenten benötigt wird. [9, 308, 313, 314] In der frühen G_1 -Phase kommt insbesondere

der Proteinkinase CDK4 sowie dem Cyclin D diese Rolle zu, in der späten G₁-Phase am Übergang zur S-Phase dem Heterodimer Cyclin E/CDK2. [7, 9]

Im Rahmen der zellzyklusabhängigen tubulären Hypertrophie, wie sie beispielsweise auch unter TGF β im in vitro-Modell [9, 25, 304, 311] beobachtet wird, kommt es nach Eintritt in die G₁-Phase infolge eines mitogenen Signals zunächst zwar noch zur Aktivierung des Cyclin D/CDK4-Komplexes bei zugleich allerdings supprimierter Kinaseaktivität der mit Cyclin E assoziierten CDK2. Folglich entfällt die Einleitung der Synthese-Phase sowie die Transkription sämtlicher dafür typischer Gene und die Zelle verbleibt in der G₁- bzw. Wachstumsphase, sodass eine Zunahme des Proteingehalts und damit verbundene Zellvergrößerung resultiert. [7, 25, 48, 49, 128]

Meine Untersuchungen mittels RTqPCR bezüglich der CDK2-Expression zeigten nach Bezug auf das Housekeeping-Gen RP L32 eine signifikante Herunterregulation in den perfundierten Zellen auf 69,1 % verglichen mit den Kontrollzellen. Auch die Expression der CDK4 sank in den hypertrophierten Zellen auf 82,0 % gegenüber den statisch inkubierten Zellen ab; die Abnahme war dabei jedoch nicht signifikant (Abb. 3.11). Die ermittelten Daten zur CDK2-Expression sind somit sehr gut mit dem aus der Literatur bekannten und zuvor beschriebenen zellzyklusabhängigen Mechanismus der Hypertrophie, charakterisiert an kultivierten renalen epithelialen Zellen [81], vereinbar. Darüber hinaus zeigten Liu und Preisig 2002 mit Hilfe eines in vivo-Modells, dass die durch Uninephrektomie in Mäusen induzierte kompensatorische renale Hypertrophie im Grunde mit demselben Aktivitätsmuster der G₁-Kinasen, das man aus in vitro-Studien kennt, assoziiert ist. [7] Im Anschluss an eine einseitige Entfernung der Niere bei Ratten fanden sie dagegen neben der Aktivitätszunahme der CDK4 auch eine Steigerung der CDK2-Aktivität, was auf den ersten Blick nicht zum Zellkulturmodell der zellzyklusabhängigen Hypertrophie sowie der durch Diabetes mellitus induzierten Hypertrophie passt. [7, 25, 303] Bei gleichzeitig jedoch fehlender Zunahme der BrdU-Inkorporation als Maß für die DNA-Synthese ist anzunehmen, dass die Aktivierung der CDK2 nicht effektiv genug war, um den Eintritt der Zellen in die S-Phase zu bewirken. Somit wird die Regulation der Cyclin-abhängigen G₁-Kinasen bei Ratten letztlich doch mit der in vitro-Situation sowie dem in vivo-Modell bei Mäusen vergleichbar. [7] Anders als die Ergebnisse zur CDK2-Regulation decken sich meine Daten zur CDK4-Expression weniger gut mit dem bereits dargestellten Modell, das eine unbeeinträchtigte Aktivität der CDK4 beschreibt. Allerdings handelt es sich auch in meinen Versuchen im Gegensatz zur CDK2-Expression um eine vom Ausmaß her weniger ausgeprägte sowie nicht signifikante Herabregulation der CDK4. Denkbar wäre zunächst, dass es durch die Blockade des

Zellzyklus am G₁/S-Übergang bei Ausbleiben des zweiten Phosphorylierungsschrittes - erkennbar an der gemessenen verminderten CDK2-mRNA-Konzentration - zu einer Hemmung der Zellteilung und schließlich zu einer geringeren Zellzahl bei den perfundierten Zellen mit tendentiell reduzierter CDK4-mRNA kommt. Diese potentielle Erklärung dürfte allerdings aufgrund des Einsatzes durchweg identischer RNA-Mengen (1 µg) ausgeschlossen werden können. Aus diesem Grund muss insbesondere auch eine Regulation auf Proteinebene in Erwägung gezogen werden. Nachdem für die katalytische Aktivität der CDKs verschiedene Cycline, zellzyklusspezifisch exprimierte Proteine, verantwortlich sind, könnte die verminderte Expression der CDK4 in vitro auch durch eine verstärkte Stimulation der vorhandenen Enzyme ausgeglichen werden. Darüber hinaus reicht möglicherweise die vorhandene Aktivität noch aus, um einen gewissen in der G₁-Phase benötigten Schwellenwert zu überschreiten.

Für die Entwicklung der zellzyklusabhängigen Hypertrophie werden zwei Kriterien vorausgesetzt. Wie bereits angedeutet muss es einerseits zu einer Unterbrechung des Zellzyklus in der G₁-Phase kommen, sodass das Retinoblastoma-Protein (pRB) aktiv bleibt und damit der Transkriptionsfaktor E2F durch Bindung an das pRB in seiner inaktiven Form persistiert. Einen Hinweis darauf liefert die Tatsache, dass hypertrophierte Zellen nur eine DNA-Kopie aufweisen. Andererseits wird ein mitogenes Signal für notwendig erachtet, das die ruhenden Zellen reaktiviert, d.h. in die G₁-Phase überführt und die dafür typischen Prozesse einleitet. Insofern nehmen das Retinoblastoma-Protein und sein Phosphorylierungszustand eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung der renalen tubulären Hypertrophie ein. [9, 304] In der Zellkultur wird stets diese Wachstumsphase G₁ durchlaufen und die Zellen proliferieren. In vivo dagegen weisen die tubulären Epithelzellen der Niere unter physiologischen Bedingungen eine sehr niedrige Teilungsrate auf, d.h. sie befinden sich ganz überwiegend in der G₀-Phase und müssten erst durch beispielsweise EGF oder HGF gereizt werden. Verdeutlicht wird dieser geringe Zellumsatz der Niere, insbesondere bei Erwachsenen, beispielsweise mit Hilfe von Immunfärbungen des PCNA und Ki-67. [49, 307, 315, 316] Ki-67, ein nukleäres Antigen, wird nämlich in allen aktiven Phasen (G₁, S, G₂, Mitose) des Zellzyklus exprimiert, fehlt jedoch in ruhenden Zellen (G₀-Phase) und ist somit als Proliferationsmarker besonders gut zur Bestimmung der Wachstumsfraktion eines Gewebes geeignet. [309, 310] Dass ein entsprechender mitogener Stimulus daher vor allem in der in vivo-Situation von Bedeutung ist, wird auch in der vorliegenden Arbeit bestärkt, indem kein Wachstumsfaktorzusatz zur Induktion einer Hypertrophie erforderlich war.

Anhand dieser Beobachtungen zur Genexpression der Cyclin-abhängigen Kinasen im in vitro-Flussmodell bestätigt sich die Annahme, dass es sich hierbei um regulierte Gene handelt. Darüber hinaus lässt sich durch den Gebrauch von RP L32, das sich im verwendeten System als nicht reguliertes Gen erwiesen hatte, die Herunterregulation der Kinasen tatsächlich als Folge der Hypertrophie im Rahmen der Perfusion interpretieren.

Ganz entscheidend für die funktionelle Inaktivierung des Retinoblastoma-Proteins sowie Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F und damit verbunden die Einleitung der S-Phase ist die vollständige Phosphorylierung des pRB, welche nur durch das sequentielle Zusammenwirken von mindestens zwei verschiedenen G₁-Cyclin-Kinase-Komplexen ermöglicht wird. Für die abschließende Wirkungsentfaltung der CDK2 muss demnach das CyclinD/CDK4-Heterodimer zuvor schon seinen Beitrag geleistet haben. [305] In dieser Hinsicht erscheint die Herabregulation der beiden G₁-Kinasen CDK2 und 4 im verwendeten Zellmodell durchaus plausibel, da in der Folge keine effektive Phosphorylierung des pRB erreicht wird und der G₁/S-Übergang des Zellzyklus behindert wird. Im vorliegenden System kam es demnach also zu einem flussinduzierten Zellzyklusarrest und nachfolgender Hypertrophie, sodass seine Eignung für weitere Untersuchungen, basierend auf der „workload“-Hypothese, damit untermauert wurde. Die Bedeutung des Cyclin E/CDK2-Komplexes besteht wie in der Literatur bereits dargestellt auch in diesem Modell in der Festlegung des Wachstumsmusters, d.h. aus seiner fehlenden oder insuffizienten Aktivierung resultieren letztlich hypertrophe Zellen. [7, 9, 312]

3.3 Regulation der NP-Rezeptoren sowie der NEP 24.11

Im nächsten Schritt sollten potentielle Veränderungen der Expression des natriuretischen Peptidrezeptors NPR-A sowie des Clearance-Rezeptors NPR-C und der NEP 24.11 in Abhängigkeit vom tubulären Fluss in vitro bestimmt werden, um grundsätzlich einen Einblick in ihre Regulation zu erhalten und gleichzeitig den lokalen Einfluss der NPs auf die Hypertrophie besser einschätzen zu können.

Im Hinblick auf die Regulation der Aktivität des NPR-A wird in der Literatur zunächst eine Hormonabhängigkeit beschrieben. So bewirkt eine chronische Exposition der GC-A gegenüber ihren Liganden eine Stimulation der Dephosphorylierung des Rezeptors, was schließlich mit einer Reduktion der Aktivität, auch als Desensibilisierung bezeichnet, verbunden ist. [30, 228, 306] Besonders in der kurzfristigen Steuerung der Rezeptoraktivität

spielt der dargestellte, posttranskriptionelle Mechanismus eine Rolle. [232] Für eine anhaltende Reduktion der NPR-A-Aktivität konnte in vitro durch Stimulation mit 100 nM ANP über 48 h dagegen insbesondere eine verminderte mRNA-Konzentration der GC-A und damit eine Regulation auf der Genexpressionsebene verantwortlich gemacht werden. Aus der Tatsache, dass auch eine Exposition kultivierter Zellen gegenüber 8-Br-cGMP bzw. Phosphodiesteraseinhibitoren eine Herunterregulation induzierte, ist ein durch eine intrazelluläre cGMP-Erhöhung vermittelter Mechanismus anzunehmen. [233, 317] Darüber hinaus wird auch eine unter anhaltendem ANP-Einfluss induzierte verstärkte GC-A-Degradierung und in der Folge verminderte Rezeptoranzahl beschrieben. [192, 319]

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei den beiden Rezeptoren NPR-A und NPR-C in der Tat um regulierte Gene handelt. Infolge des mechanischen Reizes durch die Perfusion wurde eine hoch signifikante Herunterregulation der GC-A auf 37,4 % sowie des NPR-C auf 22,0 % verglichen mit den Kontrollzellen festgestellt (Abb. 3.13). Analog zu diesen in vitro-Daten bestätigte sich die Herabregulation der beiden Rezeptoren auch im in vivo-Modell der kompensatorischen Hypertrophie. So war in Versuchen von Dr. Andrea Schreiber 72 h nach der bei Wildtyp-Mäusen durchgeführten Uninephrektomie eine Reduktion der mRNA in der verbliebenen rechten Niere sowohl für NPR-A als auch NPR-C um etwa 20 % im Vergleich zur Kontrollniere „zum Schein“-operierter Tiere zu verzeichnen. [179] Basierend auf den von mir ermittelten in vitro-Daten zur GC-A-Expression ist unter Berücksichtigung der aus der Literatur bekannten Erkenntnisse im Umkehrschluss somit durchaus eine durch die imitierte Hyperfiltration ausgelöste Sekretion von z.B. ANP und folgende autokrine bzw. parakrine Wirkung durch Bindung an die GC-A denkbar.

Die Konzentration und damit Wirkung der NPs wird allerdings nicht nur über das Ausmaß ihrer Synthese und Freisetzung bestimmt. Vielmehr spielen hierbei auch die Mechanismen der Elimination eine entscheidende Rolle. Einen wesentlichen Beitrag insbesondere auch zur Regulation der lokalen ANP- bzw. BNP-Konzentration leistet der bereits erwähnte und als Clearance-Rezeptor fungierende NPR-C, indem er sowohl ANP als auch BNP nach Bindung und rezeptorvermittelter Internalisierung dem lysosomalen Abbau zuführt und insofern aus dem Plasma ebenso wie aus dem Extrazellulärraum entfernt. [11-13, 210, 318] Eine Herunterregulation des NPR-C, wie sie sich in meinen in vitro-Untersuchungen zeigte, führt aufgrund einer dadurch bedingten längeren Halbwertszeit wiederum zu einer erhöhten lokalen Konzentration biologisch aktiver NPs und spricht damit zumindest im untersuchten

Superfusionsmodell für eine durch ihre lokale Produktion und Wirkung verursachte tubuläre Hypertrophie.

Als zweiter bedeutender Abbauweg der NPs ist der über die neutrale Endopeptidase 24.11 zu berücksichtigen. Es handelt sich dabei um eine membrangebundene zinkabhängige Metallopeptidase, welche in der Niere insbesondere im Bürstensaum des proximalen Tubulus zu finden ist. [15, 204-206] Durch hydrolytische Spaltung der Ringstruktur, die für die biologische Aktivität der NPs essentiell ist, bewirkt dieses weit verbreitete Enzym die Inaktivierung vieler verschiedener Substrate. [201-206] Nachdem bereits eine Herabregulation im Bereich des rezeptorvermittelten Eliminationsmechanismus festgestellt werden konnte, sollte im Anschluss auch die Expression der NEP 24.11 in Abhängigkeit von der Perfusion im in vitro-Modell betrachtet werden. Tatsächlich erwies sich auch die NEP 24.11 als reguliertes Gen. Verglichen mit der NPR-C-Expression erfolgte die Steuerung der NEP 24.11-Aktivität in analoger Art und Weise. Nach Superfusion der kultivierten Zellen nahm der mRNA-Gehalt bezogen auf die statische Kontrolle signifikant fast auf die Hälfte ab (Abb. 3.15). Die aus diesem Ergebnis abzuleitende Konzentrationszunahme natriuretischer Peptide direkt am Ort des Wirkungseintritts ist sehr gut mit den bereits dargestellten Daten sowie der aufgestellten Hypothese vereinbar.

Insgesamt passen diese Befunde sehr gut zur zentralen Rolle der NPs im Rahmen der kompensatorischen tubulären Hypertrophie der Niere. Die postulierte lokale Sekretion natriuretischer Peptide induziert durch die tubuläre Mehrbeladung könnte tatsächlich über eine permanente Bindung an den NPR-A und sozusagen Daueraktivierung zur Reduktion seiner Expression und damit einer Art Desensibilisierung beitragen. Dieser Effekt scheint zusätzlich dadurch verstärkt zu werden, dass die zwei wesentlichen Eliminationswege - über den NPR-C sowie die NEP 24.11, beide in der Niere hoch exprimiert [204, 205, 210] - unter mechanischer Belastung durch die Superfusion deutlich herunterreguliert werden, wodurch die Konzentration wirksamer NPs weiter steigt. Die erwähnte Hypothese der lokalen Produktion natriuretischer Peptide im proximalen Tubulus ist insoweit als bestätigt anzusehen. Als Beispiel für eine in vivo-Studie, die mit meinen in vitro-Daten harmoniert, sei die Untersuchung von Totsune et al. 1998 angeführt. Hier wurde bei Ratten nach 5/6 Nephrektomie eine Heraufregulation des pro-ANP Gens im verbliebenen Nierengewebe festgestellt. [185]

3.4 Bedeutung verschiedener Transportproteine des proximalen Tubulus sowie des AT_{1A}-Rezeptors

Zur Etablierung des in vitro-Flusssystems der primären proximalen Tubuluszellen der Maus als Zellkulturmodell für die kompensatorische renale Hypertrophie im Sinne der „workload“-Hypothese wurde im Verlauf die Regulation zweier typischer Transportproteine des proximalen Tubulus sowie die Expression des AT_{1A}-Rezeptors untersucht.

Im Rahmen der kompensatorischen Hypertrophie infolge eines Verlusts von funktionstüchtigem Nierengewebe sind bekanntermaßen sowohl strukturelle als auch funktionelle Anpassungsvorgänge zu beobachten. [1, 50, 113] Unter anderem kommt es zu einer Hyperfiltration in den verbliebenen Nephronen und einer daraus resultierenden Mehrbeladung des proximalen Tubulus. [50] Im Zusammenhang mit der „workload“-Hypothese wäre es denkbar, dass das mit der Flussteigerung einhergehende erhöhte Substratangebot an der Regulation des Zellwachstums beteiligt sein könnte. Einen Hinweis darauf liefern zum einen Experimente, in denen eine anhaltende Zunahme der Na⁺-Aufnahme mit der Hypertrophie proximaler Tubuluszellen assoziiert ist. [14, 17, 120] So führte beispielsweise die Stimulation der Na⁺-Absorption durch Behandlung mittels Insulin für 24 h bzw. durch Zusatz von hypertoner NaCl-Lösung zum Kulturmedium in der Primärkultur proximaler Tubuluszellen vom Kaninchen bei Fine und seinen Kollegen zur Aktivitätszunahme des Na⁺-H⁺-Antiports sowie zur Steigerung des Proteingehalts der Zelle und des Zellvolumens als Ausdruck der Hypertrophie. [17] Auch bei der durch Diabetes induzierten renalen Hypertrophie weisen die Befunde von Kumar et al. darauf hin, dass ein erhöhter intrazellulärer Na⁺-Gehalt der Zelle darin involviert sein könnte. Es wurde vermutet, dass durch die Zunahme an filtrierter Glucose eine Stimulation des Na⁺-Glucose-Symports und folglich eine erhöhte Na⁺-Konzentration der Zelle bedingt sein könnte. [159] Wie verschiedene in vitro-Studien zeigen, könnte der beschriebene Anstieg des Na⁺-Gehalts der Zelle schließlich auch die Sekretion autokriner Wachstumsfaktoren induzieren, die sowohl direkt als auch indirekt das Zellwachstum beeinflussen sollen. [14] Zum anderen wurde unmittelbar nach Verlust von Nierengewebe eine Aktivierung verschiedener Transportproteine im Bereich des proximalen Tubulus beobachtet, der allgemein für seine ausgeprägte Resorptionsleistung [34-36] bekannt ist. In diesem Kontext ist in der Literatur hauptsächlich vom Glucosetransport sowie dem für den Säure-Basen-Haushalt bedeutsamen Na⁺-H⁺-Austauscher (NHE₃) die Rede, welche beide einen Anstieg des intrazellulären Na⁺-Gehalts bedingen, der ja gerade im Hinblick auf die Hypertrophie von Bedeutung zu sein

scheint. [1, 16, 17, 49] Passend zu diesen Befunden konnte Wang 2006 in vitro an proximalen Tubuli der Maus demonstrieren, dass verschiedene Transporter, insbesondere auch der NHE₃, durch den axialen Fluss eine Steigerung ihrer Aktivität erfahren. [98]

Aus Versuchen unserer Arbeitsgruppe [179] hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen erhöhter Transportleistung und den strukturellen Veränderungen der tubulären Hypertrophie ergaben sich zwar Hinweise auf einen Einfluss des SGLT1, nicht jedoch des NHE₃. Nach Inkubation von LLC-PK₁-Zellen mit Phloridzin, einem Hemmstoff des Na⁺/Glucose-Cotransporters SGLT1 [106], kam es zu einer deutlich reduzierten Hypertrophie verglichen mit den unter Kontrollbedingungen superfundierten Zellen. Dagegen beeinträchtigte die Blockade des Na⁺/H⁺-Antiporters mittels EIPA [108] in vitro den flussinduzierten Anstieg der Protein/DNA-Ratio als Ausdruck der Hypertrophie nicht wesentlich.

Basierend auf den angeführten Ergebnissen erschien es sinnvoll, exemplarisch die Regulation des SGLT1 sowie des NHE₃ - beide verbunden mit einer Na⁺-Aufnahme in die Zelle - in vitro in Abhängigkeit von der mechanischen Belastung im Perfusionssystem zu untersuchen.

Der in der Niere vor allem spätproximal (S3-Segment) in der apikalen Zellmembran lokalisierte Na⁺-abhängige Glucosetransporter SGLT1 ermöglicht die Glucoseresorption über einen sekundär aktiven Mechanismus, d.h. unter Nutzung des durch die Na⁺-K⁺-ATPase unter ATP-Verbrauch aufrechterhaltenen Na⁺-Konzentrationsgradienten. Dabei wird jeweils ein Glucosemolekül zusammen mit 2 Na⁺-Ionen in die Zelle geschleust. [34-36, 40] Bei dem ebenfalls sekundär aktiven Antiportcarrier NHE₃ handelt es sich um die vorherrschende Isoform, die im proximalen Tubulus den Na⁺-H⁺-Austausch ermöglicht. [34-36, 98, 170] Zwar war für beide Gene eine Regulation nachweisbar. Entgegen der aufgrund der angestellten Überlegungen erwarteten Aktivitätssteigerung der Transporter, zeigte sich jedoch in meinen mittels RTqPCR gewonnenen Daten nach Perfusion eine deutlich verminderte Expression der beiden Transportproteine. Der NHE₃-mRNA-Gehalt nahm dabei in den superfundierten Zellen auf 47,3 % der Kontrolle ab, die SGLT1-mRNA auf 32,6 % (Abb. 3.17). Prinzipiell können an der Regulation von Membranproteinen verschiedene Mechanismen beteiligt sein. So kann einerseits die Anzahl der in der Plasmamembran vorhandenen Transporter gesteuert werden. Dies könnte entweder über das Ausmaß der Transkription und damit der Genexpression oder über die Degradierung erfolgen. Andererseits besteht auch die Möglichkeit die Aktivität der bereits in der Membran vorhandenen Transporter auf funktioneller Ebene oder Proteinebene zu modulieren. Letzteres dürfte auch im vorliegenden Flussmodell von zentraler Bedeutung sein. Insbesondere in der

Zellkultur, wie sie in meinen Versuchen zur Anwendung kam, ist zu berücksichtigen, dass der basolaterale Abschnitt der Plasmamembran der proximalen Tubuluszellen angewachsen ist. Dies beeinträchtigt eventuell den üblichen Transport der Ionen über die basolaterale Membran und blockiert möglicherweise die Aktivierung des Transportersystems auf der Genexpressionsebene.

Angiotensin II spielt im Zusammenhang mit der renalen Funktion eine wesentliche Rolle. Hauptsächlich beteiligt ist es dabei an der Regulation des Gefäßmuskeltonus, der GFR sowie des Ionentransports. Vermittelt wird der Großteil seiner physiologischen Effekte durch den Typ 1 Angiotensin II Rezeptor (AT_1), von welchem sowohl in der Maus als auch in der Ratte die zwei Subtypen AT_{1A} und AT_{1B} bekannt sind. Während die AT_{1A} -Rezeptor-mRNA in der Niere dominiert, ist dagegen die Expression des Typ 2 Angiotensin II Rezeptors (AT_2) in der adulten Niere nur äußerst gering ausgeprägt. [73, 92, 93] Für das in der Zellkultur als Wachstumsfaktor wirkende Angiotensin II konnte ein hypertrophieinduzierender Effekt bereits für verschiedene renale Zelllinien ebenso wie für primäre proximale Tubuluszellen gezeigt werden. In diesem Kontext erwies sich insbesondere der AT_1 -Rezeptor als maßgeblich. [18, 286-289]

Joly et al. führten auf diesem Gebiet eine Studie zur Regulation der Angiotensin II Rezeptoren anhand zweier in vivo-Modelle der kompensatorischen renalen Hypertrophie bei Ratten durch. Bei der einen Gruppe handelte es sich um eine durch Uninephrektomie induzierte Hypertrophie, im anderen Fall durch subtotale Nephrektomie. Während infolge der unilateralen Nephrektomie keine Modifikation der Genexpression des AT_{1A} -Rezeptors nachzuweisen war, trat vier Wochen nach subtotaler Nephrektomie eine signifikante Abnahme der AT_{1A} -Rezeptor-mRNA im verbliebenen Nierengewebe in Erscheinung. Daraus war zu folgern, dass die renale Hypertrophie an sich die Expression des AT_1 -Rezeptors nicht beeinflusst. [73] Basierend auf diesen Befunden aus der Literatur sollte nun untersucht werden, wie sich die Expression des AT_{1A} -Rezeptors unter den konkreten Bedingungen im in vitro-Flussmodell verändert. Eine Auswertung der mittels RTqPCR erhobenen Daten war allerdings nicht möglich, da eine zu geringe Konzentration an AT_{1A} -Rezeptor-mRNA in den Proben detektiert wurde, um eine verlässliche Aussage treffen zu können.

4. Lokale Produktion natriuretischer Peptide im proximalen Tubulus als Vermittler der kompensatorischen Hypertrophie im in vitro-Zellmodell

Nachdem im vorausgehenden Abschnitt das im Folgenden weiter verwendete in vitro-Zellmodell charakterisiert und generell die Fähigkeit der primären proximalen Tubuluszellen zur Entwicklung einer flussinduzierten Hypertrophie bestätigt worden war, sollte nun der zugrunde liegende Mechanismus untersucht werden, über welchen eine tubuläre Mehrbelastung schließlich die Hypertrophie vermittelt. Im Besonderen galt es mit Hilfe weiterer Versuche die hierzu aufgestellte Hypothese einer lokalen Produktion natriuretischer Peptide im proximalen Tubulus infolge des gesteigerten tubulären Flusses als initiiierendes Signal für die Hypertrophie zu verifizieren. In Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe an PTC aus GC-A-KO-Mäusen hatte sich nämlich bereits gezeigt, dass das Fehlen des natriuretischen Peptidrezeptors A mit dem Verlust der Fähigkeit zur flussinduzierten Hypertrophie einhergeht. Nachdem der NPR-A als gemeinsamer Rezeptor der Hormone ANP, BNP sowie Urodilatin fungiert, befassten sich die weiteren Experimente zudem mit der Bedeutung, welche den einzelnen Vertretern der NPs in der gegebenen in vitro-Situation zukommt - auch im Vergleich zu den in vivo bereits gemachten Beobachtungen und Schlussfolgerungen unserer Arbeitsgruppe.

4.1 Bedeutung von ANP bzw. Urodilatin

Zunächst wurde das Augenmerk gemäß der aufgestellten Hypothese auf die mögliche Wirkung von ANP bzw. Urodilatin als autokrine Wachstumsfaktoren im Rahmen der tubulären Hypertrophie gelegt. ANP sowie das durch alternative Prozessierung des ANP-Vorläuferpeptids gebildete Urodilatin waren insbesondere aufgrund ihrer bekannten renalen Expression in Betracht zu ziehen. [8, 22, 68, 177, 189, 190] Obwohl die Niere hauptsächlich als ein Zielorgan der Wirkungsentfaltung der NPs [69, 245-247, 259] gilt, implizieren inzwischen nämlich auch zahlreiche Studien die Niere als Quelle und somit Ort der Synthese der NPs. Diese Erkenntnisse basieren dabei auf Befunden, die sowohl auf der Protein- als auch auf der mRNA-Ebene gewonnen wurden. [52-57, 65-68, 181] Aufgrund dieser Beobachtungen erscheint die Existenz eines intrarenalen natriuretischen Peptidsystems sehr gut vorstellbar.

Der Nachweis von pro-ANP-mRNA gelang sowohl im proximalen als auch im distalen Tubulus. Immunhistochemisch konnte außerdem Urodilatin überwiegend im distalen Tubulus,

ANP dagegen hauptsächlich im proximalen Tubulus lokalisiert werden. [20, 183] Die von Mistry et al. [158] in vitro durchgeführten Studien an frisch isolierten proximalen Tubuluszellen der Ratte bestätigten eine lokale Produktion von ANP im proximalen Tubulus und wiesen letztlich auf das Bestehen eines autokrinen natriuretischen Peptidsystems hin, das für die Kontrolle des Zellwachstums von Bedeutung sein könnte. Urodilatin ist darüber hinaus sogar ausschließlich renalen Ursprungs und wird luminal sezerniert, sodass es als das renale natriuretische Peptid schlechthin parakrin wirken kann. [8, 22, 26, 52, 177, 182, 190] Im Blut zirkuliert es dagegen nur in äußerst geringen Konzentrationen. [184] Im Sinne eines parakrinen Wirkungsmechanismus gibt es für ANP und Urodilatin bereits Hinweise auf eine Beteiligung an der lokalen Regulation der renalen Salz- und Wasserausscheidung über eine direkte tubuläre Wirkung. [22, 26, 177, 190] Unter Berücksichtigung dieser Befunde können auch lokale Effekte des ANP bzw. Urodilatin in anderen Bereichen wie beispielsweise der Regulation des Zellwachstums in Erwägung gezogen werden. Darüber hinaus bestätigt die von Totsune [185] und seinen Kollegen in vivo gezeigte Heraufregulation des pro-ANP-Gens im verbliebenen Nierengewebe nach 5/6 Nephrektomie bei Ratten diese Vermutung, dass neben der klassisch hormonellen also systemischen Wirkung von ANP tatsächlich auch ein parakriner bzw. autokriner Einfluss auf das Tubuluswachstum im Rahmen der renalen Anpassungsvorgänge bestehen könnte.

Um nun basierend auf diesen Überlegungen die Rolle von lokal gebildetem ANP und Urodilatin im Zusammenhang mit der Hypertrophieinduktion in vitro besser zu verstehen, wurden aus ANP-KO-Mäusen isolierte primäre proximale Tubuluszellen herangezogen. Bei diesem Mäusestamm wurde das für das pro-ANP codierende Exon 2 deletiert, sodass dadurch neben der ANP-Synthese auch die Urodilatin-Produktion in der Niere aufgehoben ist. [31] Nachfolgende Versuche ermöglichen demnach lediglich einen Bezug der Ergebnisse allgemein auf die beiden Spaltprodukte des ANP-Prohormons, jedoch keine Differenzierung zwischen einer ANP- oder Urodilatinwirkung. Mit diesem Wissen im Hinterkopf ist im Folgenden zusammenfassend stets allgemein von ANP die Rede.

Um das Ausmaß der flussinduzierten Hypertrophie bei den Wildtypzellen mit dem bei ANP-KO-Zellen anhand der Protein/DNA-Ratio überhaupt vergleichen zu können, musste dieses Verhältnis zunächst im unbehandelten Zustand für beide Genotypen ermittelt werden. Wie aus Abb. 3.18 hervorgeht, konnten grundlegende Abweichungen in der Zellgröße ausgeschlossen werden, sodass von gleichen Ausgangsbedingungen für die weiteren Versuche auszugehen ist.

Um nun Hinweise auf die Bedeutung von ANP im Rahmen der flussinduzierten Hypertrophie zu erhalten, wurden im bereits beschriebenen in vitro-Flusssystem parallel Wildtypzellen und ANP-KO-Zellen für 24 h dem Reiz der Perfusion ausgesetzt. Beide Zelltypen zeigten dabei als Folge der Superfusion eine signifikante Zunahme des Protein/DNA-Quotienten. Während es bei den perfundierten Wildtypzellen zu einem Anstieg der Ratio um 30 % kam, war bei den entsprechenden ANP-KO-Zellen jedoch lediglich eine Zunahme um 13 % festzustellen. Das Ausmaß der flussinduzierten Hypertrophie betreffend ergab sich in vitro ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden getesteten Genotypen (Abb. 3.20). Daraus lässt sich folgern, dass zwar prinzipiell auch ANP-KO-Zellen zumindest im in vitro-Modell noch in der Lage sind, als Reaktion auf den imitierten Fluss zu hypertrophieren. Dies ist allerdings nur in deutlich abgeschwächter Form möglich, sodass in diesen Daten durchaus eine Bestätigung der aufgestellten Hypothese zu sehen ist.

Um schließlich die reduzierte flussinduzierte Hypertrophie der ANP-KO-Zellen tatsächlich auf das ANP-Defizit zurückführen zu können, musste ausgeschlossen werden, dass ANP-KO-Zellen generell eine eingeschränkte Fähigkeit zur Hypertrophie aufweisen. Dazu wurde als Positivkontrolle gleichzeitig eine 24-stündige Stimulation von Wildtypzellen und ANP-KO-Zellen zunächst mit TGF β (100 pM) vorgenommen, dessen hypertrophieauslösende Wirkung über die Arretierung des Zellzyklus in der G₁-Phase besonders auch bei proximalen Tubuluszellen gut erforscht ist. [2, 6, 7, 23-25] Die Tatsache, dass unter dem Einfluss von TGF β in beiden Gruppen ein signifikanter Anstieg des Proteingehalts bezogen auf die DNA-Konzentration festzustellen war und sich beim Vergleich des Ausmaßes der Hypertrophie kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Zelltypen ergab, ließ auf die grundsätzliche Möglichkeit einer uneingeschränkten Hypertrophie bei ANP-KO-Zellen schließen (Abb. 3.22). Analog dazu wurde die Inkubation mit ANP in einer Konzentration von 100 nM, welche gemäß vorangegangener Versuche am besten geeignet war, über 24 h angeschlossen, dessen antiproliferative, hypertrophieinduzierende Eigenschaften bereits zu Beginn dieser Arbeit an kultivierten proximalen Tubuluszellen der Maus bestätigt werden konnten. Die dabei gewonnenen Daten standen vollständig im Einklang mit den unter TGF β -Stimulation ermittelten Befunden (Abb. 3.24), sodass eine prinzipielle Beeinträchtigung der Hypertrophie auszuschließen war. In der Zusammenschau der Ergebnisse spricht dies letztlich zumindest für eine Mitbeteiligung von ANP als auslösender Faktor bei der flussinduzierten Hypertrophie. Eine lokale ANP-Produktion und parakrine wachstumsregulierende Wirkung gemäß Hypothese scheint demnach in vitro tatsächlich eine Rolle zu spielen.

Nachdem bereits indirekte Hinweise auf eine durch die Perfusion ausgelöste ANP-Sekretion vorlagen, sollte nun im nächsten Schritt ANP selbst nachgewiesen bzw. seine Genexpression untersucht werden. Die ANP-Konzentration im Perfusat von Wildtypzellen erwies sich jedoch derart niedrig, dass sie außerhalb des durch den Enzym-Immunoassay verlässlich messbaren Bereichs lag. Auch die mittels RTqPCR untersuchte Expression des ANP-Gens konnte aufgrund des zu geringen mRNA-Gehalts nicht reproduzierbar gemessen werden. Tendenziell war jedoch eine gesteigerte ANP-Expression der perfundierten Zellen zu erkennen. Somit gelang es zwar nicht die Hypothese einer lokalen ANP-Produktion infolge Perfusion weiter zu untermauern; dennoch ist im Hinblick auf die bei superfundierten ANP-KO-Zellen festgestellte eingeschränkte Hypertrophie anzunehmen, dass dem ANP wenigstens im in vitro-Modell eine Bedeutung als Cofaktor bei der Induktion der flussabhängigen Hypertrophie zuzuschreiben ist.

4.2 Bedeutung von BNP - Möglichkeit des Ausgleichs bei ANP-/Urodilatin-Defizit

Basierend auf der Tatsache, dass zum einen bei den perfundierten ANP-KO-Zellen eine Resthypertrophie nachweisbar war und sich zum anderen in Vorversuchen mit GC-A-KO-Zellen eine Beteiligung des natriuretischen Peptidrezeptors A als gemeinsamer Rezeptor von sowohl ANP als auch BNP zeigte, war nun auch die Möglichkeit einer lokalen BNP-Bildung im proximalen Tubulus als Mediator der flussinduzierten Hypertrophie in Erwägung zu ziehen. Die grundlegende Fähigkeit zur Hypertrophieinduktion durch eine direkte Wirkung von BNP wurde bereits in vorangehenden Versuchen dargestellt. Zudem belegen verschiedene Studien die Expression von BNP in extrakardialen Geweben, unter anderem auch in der Niere [57, 67, 158], sodass durchaus die Möglichkeit einer parakrinen bzw. autokrinen Wirkungsentfaltung mit Einfluss auf das lokale Zellwachstum gegeben ist.

Der direkte Nachweis des potentiell infolge der Superfusion von Wildtyp- bzw. ANP-KO-Zellen sezernierten BNP gelang mit Hilfe eines entsprechenden Enzym-Immunoassays aufgrund wahrscheinlich zu geringer Konzentrationen im Perfusat nicht. Im Überstand der jeweils superfundierten Zellen waren sogar noch niedrigere Werte für BNP zu messen als bei den statisch inkubierten Kontrollzellen. Ein denkbarer Erklärungsansatz hierfür wäre, dass in der Gruppe der perfundierten Zellen neben der ohnehin geringen BNP-Menge zusätzlich ein Verlust durch Haften am Schlauchmaterial (Polypropylen) auftrat. Infolgedessen musste auf die Ebene der Genexpression zurückgegriffen werden. Tatsächlich gelang es mittels RTqPCR

in den perfundierten proximalen Tubuluszellen (Wildtyp) eine gesteigerte Expression des BNP-Gens nachzuweisen. Es zeigte sich - wie schon in anderen Versuchen bezogen auf das bewährte Housekeeping-Gen RP L32, das unter dem mechanischen Reiz der Perfusion selbst keiner Regulation unterworfen ist - eine signifikante Zunahme der BNP-Transkripte infolge der Superfusion um 68,3 % des Kontrollwerts (Abb. 3.26). Somit stützt dieses Ergebnis die initial aufgestellte Hypothese einer lokalen Produktion und Wirkung natriuretischer Peptide in der Niere. Auch verhält sich dieser Befund im Hinblick auf bereits beschriebene Versuchsergebnisse zur Expression der beiden gängigen Abbaumechanismen - zum einen durch den Clearance-Rezeptor NPR-C und zum anderen über die NEP 24.11 - schlüssig: Die verminderte Expression des NPR-C und der NEP 24.11 infolge der Superfusion bewirkt nämlich analog zur vermehrten Transkription des BNP-Gens letztlich eine Zunahme an biologisch wirksamem BNP. Die gleichzeitig bei den perfundierten Zellen festgestellte Herunterregulation der GC-A könnte auf den ersten Blick zwar widersprüchlich erscheinen. Jedoch konnte gezeigt werden, dass eine länger anhaltende Exposition des Rezeptors gegenüber seinen Liganden zumindest in vitro zu einer entsprechenden Regulation auf der Genexpressionsebene führt. [192, 233-235] In diesem Kontext kann der verminderte GC-A-mRNA-Gehalt somit der verstärkten lokalen Synthese natriuretischer Peptide zugeschrieben werden. Ähnliche Beobachtungen machte auch eine koreanische Forschergruppe [28] bei Untersuchungen an Ratten mit obstruktiver Uropathie. Nach bilateraler Ligierung der proximalen Ureteren für 48 h wurde eine renale Expressionszunahme für ANP, BNP und CNP sowie eine verminderte Expression der Rezeptoren NPR-A, NPR-B und NPR-C beschrieben. Aufgrund dieser Befunde folgte man in Analogie zu meinen Ergebnissen, dass es im Rahmen der obstruktiven Uropathie zu einer gesteigerten lokalen Synthese natriuretischer Peptide kommt. Dieses Modell liefert darüber hinaus einen weiteren Beleg für die Existenz eines intrarenalen Systems natriuretischer Peptide.

Zusammenfassend konnte somit im in vitro-Modell eine Steigerung der lokalen BNP-Produktion infolge der Perfusion nachgewiesen werden. Im Hinblick auf die bei superfundierten ANP-KO-Zellen festgestellte verbleibende Hypertrophie stellt BNP als Mediator demnach eine plausible Erklärung dar. Die Theorie eines möglichen zumindest partiellen Ausgleichs des ANP-Verlusts durch BNP scheint somit bestätigt. Zum besseren Verständnis sind auf diesem Gebiet allerdings zusätzliche Experimente mit BNP-KO-Zellen notwendig.

Beim Vergleich der dargestellten Ergebnisse mit den von meiner Arbeitsgruppe in vivo erzielten Erkenntnissen fallen jedoch wesentliche Unterschiede auf. So ist bei GC-A-KO-

Mäusen die kompensatorische renale Hypertrophie infolge einer Uninephrektomie, einem gut etablierten Modell zur Untersuchung dieses Phänomens, zwar analog zur in vitro-Situation - zumindest in der frühen Phase - nahezu aufgehoben. Die GC-A als gemeinsamer Rezeptor der natriuretischen Peptide ANP und BNP ist somit wesentlich an der Induktion der kompensatorischen renalen Hypertrophie beteiligt. Allerdings zeigen ANP-KO-Mäuse nach Uninephrektomie im Gegensatz zu meinen in vitro gewonnenen Ergebnissen ein unbeeinträchtigtes kompensatorisches Nierenwachstum verglichen mit dem bei Wildtypmäusen. Zudem konnte Dr. Andrea Schreiber nach Uninephrektomie sowohl einen Anstieg der BNP-Konzentration im Plasma der Mäuse als auch eine Zunahme der kardialen Genexpression von BNP nachweisen. Daraus wurde schließlich gefolgert, dass im Hinblick auf die indirekte bzw. systemische Wirkung der natriuretischen Peptide dem BNP die Hauptrolle als Aktivator der GC-A zukommt, während ANP hier weitgehend ausgeschlossen wurde. [179]

Dies verdeutlicht wiederum, dass die Übertragung von in vitro erhobenen Befunden auf die in vivo-Situation - und umgekehrt - nur begrenzt erfolgen kann. In vivo sind die Umgebungsbedingungen weniger gut kontrollierbar als in der Zellkultur. Insbesondere systemische Einflüsse und die Interaktion verschiedener Systeme sind bei Versuchen am gesamten Organismus immer zu berücksichtigen. So könnte im beschriebenen Fall der ANP-KO-Mäuse eben der Einfluss durch das in vivo zusätzlich kardial synthetisierte BNP den vollständigen Ausgleich des ANP-Defizits und in der Folge die uneingeschränkte Hypertrophie bedingen. Kultivierte Zellen, die eine derartige Exposition nicht aufweisen, könnten zudem im Vergleich zur in vivo-Situation abweichende Eigenschaften besitzen. Beispielsweise wäre es möglich, dass in vitro die Expression der NPRs nicht exakt mit dem in vivo-Phänotyp übereinstimmt und daraus eine unterschiedliche Relevanz der NPs resultiert.

Auch wenn auf dem Gebiet der kompensatorischen renalen Hypertrophie weiterhin viele ungeklärte Fragen bestehen bleiben, so konnte diese Arbeit dennoch einen wichtigen Beitrag zur weiteren Aufklärung dieses Phänomens leisten.

V. Zusammenfassung

Bis heute konnten die an der Entstehung der kompensatorischen renalen Hypertrophie infolge des Verlusts von funktionsfähigem Nierengewebe beteiligten Mechanismen trotz intensiver Bemühungen nicht gänzlich aufgeklärt werden. Im Hinblick auf die Erforschung der dabei zugrunde liegenden Prozesse liefert die vorliegende Arbeit einen wichtigen Beitrag. Ausgehend von der „workload“-Hypothese, welche die glomeruläre Hyperfiltration und die damit einhergehende Mehrbelastung des proximalen Tubulus als Initiator der Tubulushypertrophie annimmt, wurde der mögliche Einfluss einer lokalen Sekretion und damit verbundenen autokrinen Wirkung natriuretischer Peptide - insbesondere von ANP und Urodilatin - auf die flussinduzierte Hypertrophie anhand eines in vitro-Modells untersucht.

Zunächst musste in Stimulationsversuchen mit ANP und BNP eine direkt wachstumsfördernde Wirkung auf proximale Tubuluszellen als Grundvoraussetzung für weitere Überlegungen gezeigt werden. Tatsächlich war eine Konzentrationsabhängigkeit der ausgelösten Hypertrophie nachweisbar. Des Weiteren hat sich im verwendeten Zellmodell primärer proximaler Tubuluszellen die Möglichkeit einer flussinduzierten Hypertrophie und damit die Gültigkeit der „workload“-Hypothese in vitro bestätigt. Die in vitro-Daten zur Expression verschiedener in vivo beteiligter Gene zeigen, dass es in der verwendeten primären Zellkultur (PTC der Maus) in Abhängigkeit von der Perfusion zum einen zu einer deutlichen Herunterregulation der CDK2 und CDK4 sowie der GC-A, des NPR-C und der NEP 24.11 kommt. Eine derartige Regulation der betreffenden Gene steht im Einklang mit der Bedeutung der natriuretischen Peptide bei der flussinduzierten Hypertrophie und untermauert die aufgestellte Hypothese einer lokalen Produktion im proximalen Tubulus. Zum anderen war eine ausgeprägte Reduktion der Expression der Transporter SGLT1 und NHE₃ nach Superfusion nachzuweisen.

Nachdem die grundlegenden Voraussetzungen gegeben waren, wurden weitere Studien an PTC aus ANP-KO-Mäusen durchgeführt. Basierend auf Perfusionsversuchen lässt sich folgern, dass bei Fehlen von ANP bzw. Urodilatin in vitro zwar grundsätzlich noch eine Hypertrophie infolge des erhöhten Flusses möglich ist allerdings nur in abgeschwächter Form. Die Stimulation von ANP-KO-Zellen mit TGF β sowie ANP ergab keinen signifikanten Unterschied im Ausmaß der ausgelösten Hypertrophie verglichen mit Wildtypzellen. Somit liegt keine generelle Einschränkung der Hypertrophie bei ANP-KO-Zellen vor und bei der

verminderten flussinduzierten Hypertrophie ist tatsächlich von einem Effekt des ANP-/Urodilatinmangels auszugehen. Der nächste Schritt bestand im direkten Nachweis des sezernierten ANP bzw. BNP nach Perfusion von PTC der Maus, was allerdings aufgrund zu geringer Konzentrationen im Perfusat nicht gelang. Auf mRNA-Ebene gelang auch die Messung von ANP nicht verlässlich. Jedoch war eine signifikante Steigerung der Expression des BNP-Gens in den perfundierten proximalen Tubuluszellen festzustellen. Insgesamt ist also anzunehmen, dass ANP bzw. Urodilatin in vitro im Rahmen der flussinduzierten Hypertrophie zumindest die Rolle eines Cofaktors einnimmt. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine durch Superfusion bedingte lokale Produktion von BNP, sodass ein Ausgleich des ANP-Verlusts in ANP-KO-Zellen somit denkbar ist. Um die Bedeutung und den Einfluss einer lokalen Sekretion von BNP in vitro besser zu verstehen, sind weitere Studien mit Zellen aus BNP-KO-Mäusen erforderlich.

Bei all den Vorteilen, die in vitro-Studien mit sich bringen, muss jedoch grundsätzlich die Übertragung von Ergebnissen auf die in vivo-Situation mit Vorsicht erfolgen und kritisch betrachtet werden.

VI. Literaturverzeichnis

1. Hostetter, T. H. (1995). Progression of renal disease and renal hypertrophy. *Annu Rev Physiol* **57**, 263-278
2. Sinuani, I., et al. (2006). Mesangial cells initiate compensatory renal tubular hypertrophy via IL-10-induced TGF- β secretion: effect of the immunomodulator AS101 on this process. *Am J Physiol Renal Physiol* **291**(2), F384-F394
3. Kurnick, N. B., Lindsay, P. A. (1968). Compensatory renal hypertrophy in parabiotic mice. *Lab Invest* **19**(1), 45-48
4. Wesson, L. G. (1989). Compensatory growth and other growth responses of the kidney. *Nephron* **51**(2), 149-184
5. Kang, J. J., et al. (2006). Quantitative imaging of basic functions in renal (patho)physiology. *Am J Physiol Renal Physiol* **291**(2), F495-F502
6. Wolf, G., et al. (1993). Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous Transforming Growth Factor- β . *J Clin Invest* **92**(3), 1366-1372
7. Liu, B., Preisig P. A. (2002). Compensatory renal hypertrophy is mediated by a cell cycle-dependent mechanism. *Kidney Int* **62**(5), 1650-1658
8. Vesely, D. L. (2003). Natriuretic peptides and acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* **285**(2), F167-F177
9. Preisig, P. (1999). What makes cells grow larger and how do they do it? Renal hypertrophy revisited. *Exp Nephrol* **7**(4), 273-283
10. Takagi, T., et al. (2014). Compensatory hypertrophy after partial and radical nephrectomy in adults. *J Urol* **192**(6), 1612-1618
11. Maack, T., et al. (1987). Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* **238**(4827), 675-678
12. Charles, C. J., et al. (1996). Clearance receptors and endopeptidase 24.11: equal role in natriuretic peptide metabolism in conscious sheep. *Am J Physiol* **271**(2 Pt 2), R373-R380
13. Potter, L. R., Abbey-Hosch, S., Dickey, D. M. (2006). Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* **27**(1), 47-72
14. Stanton, B. A., Kaissling, B. (1989). Regulation of renal ion transport and cell growth by sodium. *Am J Physiol* **257**(1 Pt 2), F1-10
15. Akashi, Y. J., et al. (2007). Atrial natriuretic peptide and related peptides. *Clin Chem Lab Med* **45**(10), 1259-1267
16. Fine, L. G., Bradley, T. (1985). Adaptation of proximal tubular structure and function: insights into compensatory renal hypertrophy. *Fed Proc* **44**(11), 2723-2727

17. Fine, L. G., et al. (1985). Stimulation of Na^+/H^+ antiport is an early event in hypertrophy of renal proximal tubular cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**(6), 1736-1740
18. Wolf, G., et al. (1993). Angiotensin II stimulates cellular hypertrophy of LLC-PK₁ cells through the AT₁ receptor. *Nephrol Dial Transplant* **8**(2), 128-133
19. Wolf, G., et al. (2003). Angiotensin II-induced hypertrophy of proximal tubular cells requires p27^{Kip1}. *Kidney Int* **64**(1), 71-81
20. Saba, S. R., Ramirez, G., Vesely, D. L. (1993). Immunocytochemical localization of ProANF 1-30, ProANF 31-67, atrial natriuretic factor and urodilatin in the human kidney. *Am J Nephrol* **13**, 85-93
21. Nielsen, R., et al. (1998). Characterization of a kidney proximal tubule cell line, LLC-PK₁, expressing endocytotic active megalin. *J Am Soc Nephrol* **9**(10), 1767-1776
22. Levin, E. R., Gardner, D. G., Samson, W. K. (1998). Natriuretic peptides. *N Engl J Med* **339**(5), 321-328
23. Wolf, G. (1993). Regulating factors of renal tubular hypertrophy. *Clin Investig* **71**(10), 867-870
24. Sinuani, I., et al. (2009). The cyclin kinase inhibitor p57^{Kip2} regulates TGF- β -induced compensatory tubular hypertrophy: effect of the immunomodulator AS101. *Nephrol Dial Transplant* **24**(8), 2328-2338
25. Liu, B., Preisig, P. (1999). TGF-beta1-mediated hypertrophy involves inhibiting pRB phosphorylation by blocking activation of cyclin E kinase. *Am J Physiol* **277**(2 Pt 2), F186-F194
26. Forssmann, W., Meyer, M., Forssmann, K. (2001). The renal urodilatin system: clinical implications. *Cardiovasc Res* **51**(3), 450-462
27. Hull, R. N., Cherry, W. R., Weaver, G. W. (1976). The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK₁. *In Vitro* **12**(10), 670-677
28. Kim, S. W., et al. (2002). Local renal and vascular natriuretic peptide system in obstructive uropathic rats. *Urol Res* **30**(2), 97-101
29. Vinay, P., Gougoux, A., Lemieux, G. (1981). Isolation of a pure suspension of rat proximal tubules. *Am J Physiol* **241**(4), F403-F411
30. Joubert, S., Labrecque, J., De Léan, A. (2001). Reduced activity of the NPR-A kinase triggers dephosphorylation and homologous desensitization of the receptor. *Biochemistry* **40**(37), 11096-11105
31. John, S. W., et al. (1995). Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension. *Science* **267**(5198), 679-681
32. Mullin, J. M., et al. (1980). Sugar transport in the LLC-PK₁ renal epithelial cell line: similarity to mammalian kidney and the influence of cell density. *J Cell Physiol* **104**(3), 375-389
33. Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R. (2008). *Duale Reihe: Biochemie*, 2. Auflage, Thieme, Stuttgart

34. Behrends, J. C., et al. (2010). Duale Reihe: Physiologie, 1. Auflage, Thieme, Stuttgart
35. Widmaier, E. P., Raff, H., Strang, K. (2011). Vander's Human Physiology, The Mechanisms of Body Function, 12. Edition, McGraw-Hill, New York
36. Klinke, R., Pape, H.-C., Silbernagl, S. (2005). Physiologie, 5. Auflage, Thieme, Stuttgart - New York
37. Lüllmann-Rauch, R. (2006). Taschenlehrbuch Histologie, 2. Auflage, Thieme, Stuttgart - New York
38. Mülhardt, C. (2009). Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics, 6. Auflage, Spektrum, Heidelberg
39. Lindl, T., Gstraunthaler, G. (2008). Zell- und Gewebekultur, Von den Grundlagen zur Laborbank, 6. Auflage, Spektrum, Heidelberg
40. Wood, I. S., Trayhurn, P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* **89**(1), 3-9
41. Morton, M. J., et al. (2004). Human podocytes possess a stretch-sensitive, Ca^{2+} -activated K^{+} channel: potential implications for the control of glomerular filtration. *J Am Soc Nephrol* **15**(12), 2981-2987
42. Pavenstädt, H., Kriz, W., Kretzler, M. (2003). Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* **83**(1), 253-307
43. Salmon, A. H., et al. (2007). Evidence for restriction of fluid and solute movement across the glomerular capillary wall by the subpodocyte space. *Am J Physiol Renal Physiol* **293**(6), F1777-1786
44. Drenckhahn, D., Franke, R. P. (1988). Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man. *Lab Invest* **59**(5), 673-682
45. Fine, L. (1986). The biology of renal hypertrophy. *Kidney Int* **29**(3), 619-634
46. Gesek, F. A., Wolff, D. W., Strandhoy, J. W. (1987). Improved separation method for rat proximal and distal renal tubules. *Am J Physiol* **253**(2 Pt 2), F358-365
47. Grgic, I., Köhler, R., Hoyer, J. (2008). Ionenkanäle und Nieren- und Hochdruckerkrankungen. *Der Nephrologe* **5**, 358-365
48. Sinuani, I., et al. (2010). Mesangial cells initiate compensatory tubular cell hypertrophy. *Am J Nephrol* **31**(4), 326-331
49. Fine, L. G., Norman J. (1989). Cellular events in renal hypertrophy. *Annu Rev Physiol* **51**, 19-32
50. Hayslett, J. P. (1979). Functional adaptation to reduction in renal mass. *Physiol Rev* **59**(1), 137-164
51. Birn, H. (2006). The kidney in vitamin B12 and folat homeostasis: characterization of receptors for tubular uptake of vitamins and carrier proteins. *Am J Physiol Renal Physiol* **291**(1), F22-F36

52. Goetz, K. L. (1991). Renal natriuretic peptide (urodilatin?) and atriopeptin: Evolving concepts. *Am J Physiol* **261**(6 Pt 2), F921-932
53. Gunning, M. E., Brenner, B. M. (1992). Natriuretic peptides and the kidney: Current concepts. *Kidney Int Suppl* **38**, 127-133
54. Figueroa, C. D., et al. (1990). Cellular localisation of atrial natriuretic factor in the human kidney. *Nephrol Dial Transplant* **5**(1), 25-31
55. Ritter, D., Needleman, P., Greenwald, J. E. (1991). Synthesis and secretion of an atriopeptin-like protein in rat kidney cell culture. *J Clin Invest* **87**(1), 208-212
56. Greenwald, J. E., et al. (1991). Renal synthesis of atriopeptin-like protein in physiology and pathophysiology. *Am J Physiol* **260**(4 Pt 2), F602-607
57. Totsune, K., et al. (1994). Natriuretic peptides in the human kidney. *Hypertension* **24**(6), 758-762
58. Larsson, L., Aperia, A., Wilton, B. (1980). Effect of normal development on compensatory renal growth. *Kidney Int* **18**(1), 29-35
59. Argiles, A., et al. (1987). Acute adaptive changes to unilateral nephrectomy in humans. *Kidney Int* **32**(5), 714-720
60. Peters, G. (1978) Introduction: History and problems of compensatory adaptation of renal functions and of compensatory hypertrophy of the kidney. *Yale J Biol Med* **51**(3), 235-245
61. Dicker, S. E. (1972). Inhibition of compensatory renal growth in rats. *J Physiol* **225**(3), 577-588
62. MacKay, E. M., et al. (1932). The degree of compensatory renal hypertrophy following unilateral nephrectomy: I. The influence of age. *J Exp Med* **56**(2), 255-265
63. Shirley, D. G., Walter, S. J. (1991). Acute and chronic changes in renal function following unilateral nephrectomy. *Kidney Int* **40**(1), 62-68
64. Zalups, R. K., Diamond, G. L. (1987). Mercuric chloride-induced nephrotoxicity in the rat following unilateral nephrectomy and compensatory renal growth. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **53**(6), 336-346
65. Golomb, E., et al. (1992). Renal transcription of the gene encoding for atrial natriuretic peptide. 74th Annual Meeting of the Endocrine Society, 334
66. Greenwald, J. E., et al. (1992). Renal expression of the gene for atrial natriuretic factor. *Am J Physiol* **263**(5 Pt 2), F974-978
67. Gerbes, A. L., et al. (1994). Transcription of brain natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide genes in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* **78**(6), 1307-1311
68. McKenzie, J. C., et al. (1985). Immunocytochemical localization of atrial natriuretic factor in the kidney, adrenal medulla, pituitary, and atrium of rat. *J Histochem Cytochem* **33**(8), 828-832
69. Valentin, J. P., et al. (1993). Urodilatin binds to and activates renal receptors for atrial natriuretic peptide. *Hypertension* **21**(4), 432-438

70. Janicki, R. (1969). In Compensatory renal hypertrophy, p. 312, ed. Nowinski, W. W. & Goss, R. J. London: Academic Press
71. Dicker, S. E., Morris, C. A. (1972). Absence of compensatory renal hypertrophy in baboons. *J Physiol* **223**(2), 365-373
72. Hutson, J. M., et al. (1984). Compensatory renal growth in the mouse, III. Growth hormone and insulin deficiency. *J Pediatr Surg* **19**(1), 24-28
73. Joly, E., et al. (2005). Differential regulation of Angiotensin II receptors during renal injury and compensatory hypertrophy in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **32**(4), 241-248
74. Sugaya, K., et al. (2000). Compensatory renal hypertrophy and changes of renal function following nephrectomy. *Hinyokika Kyo* **46**(4), 235-240
75. Schweda, F., et al. (2004). Upregulation of macula densa cyclooxygenase-2 expression is not dependent on glomerular filtration. *Am J Physiol Renal Physiol* **287**(1), F95-F101
76. Wagner, C., et al. (2007). Connexin40 is essential for the pressure control of renin synthesis and secretion. *Circ Res* **100**(4), 556-563
77. van Neck, J. W., et al. (2002). High-protein induced renal enlargement is growth hormone independent. *Kidney Int* **62**(4), 1187-1195
78. Hartner, A., et al. (2003). Strain differences in the development of hypertension and glomerular lesions induced by deoxycorticosterone acetate salt in mice. *Nephrol Dial Transplant* **18**(10), 1999-2004
79. Norman, J. T., et al. (1988). Patterns of mRNA expression during early cell growth differ in kidney epithelial cell destined to undergo compensatory hypertrophy versus regenerative hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**(18), 6768-6772
80. Hauser, P., et al. (2005). Transcriptional response in the unaffected kidney after contralateral hydronephrosis or nephrectomy. *Kidney Int* **68**(6), 2497-2507
81. Preisig, P. A., Franch, H. A. (1995). Renal epithelial cell hyperplasia and hypertrophy. *Semin Nephrol* **15**(4), 327-340
82. Mullin, E. M., Bonar, R. A., Paulson, D. F. (1975). Effect of transient hydronephrosis on subsequent compensatory renal growth. *Invest Urol* **13**(2), 121-124
83. Dicker, S. E., Shirley, D. G. (1972). Compensatory hypertrophy of the contralateral kidney after unilateral ureteral ligation. *J Physiol* **220**(1), 199-210
84. Olesen, S., Madsen, P. O. (1975). Compensatory renal hypertrophy. II. During contralateral hydronephrosis. An experimental study in dogs. *Urol Res* **3**(4), 177-182
85. Zelman, S. J., Zenser, T. V., Davis, B. B. (1983). Renal growth in response to unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* **23**(4), 594-598
86. Hammond, K. A., Janes, D. N. (1998). The effects of increased protein intake on kidney size and function. *J Exp Biol* **201**(Pt 13), 2081-2090
87. Chen, J. K., et al. (2009). S6 kinase 1 knockout inhibits uninephrectomy- or diabetes-induced renal hypertrophy. *Am J Physiol Renal Physiol* **297**(3), F585-F593

88. Cingel-Ristic, V., Flyvbjerg, A., Drop, S. L. S. (2004). The physiological and pathophysiological roles of the GH/IGF-axis in the kidney: Lessons from experimental rodent models. *Growth Horm IGF Res* **14**(6), 418-430
89. Satriano, J., Vallon, V. (2006). Primary kidney growth and its consequences at the onset of diabetes mellitus. *Amino Acids* **31**(1), 1-9
90. Seyer-Hansen, K. (1978). Renal hypertrophy in experimental diabetes: a comparison to compensatory hypertrophy. *Diabetologia* **14**(5), 325-328
91. Wolf, G. (1995). Cellular mechanisms of tubule hypertrophy and hyperplasia in renal injury. *Miner Electrolyte Metab* **21**(4-5), 303-316
92. Berry, C., et al. (2001). Angiotensin receptors: Signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**(6), H2337-2365
93. Bouby, N., et al. (1997). Expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes and angiotensin II-induced calcium mobilization along the rat nephron. *J Am Soc Nephrol* **8**(11), 1658-1667
94. Kahn, C. B., Raman, P. G., Zic, Z. (1974). Kidney size in diabetes mellitus. *Diabetes* **23**(9), 788-792
95. Mogensen, C. E., Andersen, M. J. (1975). Increased kidney size and glomerular filtration rate in untreated juvenile diabetes: Normalization by insulin-treatment. *Diabetologia* **11**(3), 221-224
96. Davison, J. M. (1987). Kidney function in pregnant women. *Am J Kidney Dis* **9**(4), 248-252
97. Davison, J. M., Lindheimer, M. D. (1980). Changes in renal haemodynamics and kidney weight during pregnancy in the unanaesthetized rat. *J Physiol* **301**, 129-136
98. Wang, T. (2006). Flow-activated transport events along the nephron. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **15**(5), 530-536
99. Peterson, L. N., et al. (1987). Potassium depletion enhances renal compensatory hypertrophy in the nephrectomized rat. *Miner Electrolyte Metab* **13**(1), 57-62
100. Lytton, B., et al. (1968). The effects of ischemic injury on compensatory renal growth. *J Urol* **100**(2), 128-132
101. Segaul, R. M., Lytton, B., Schiff, M. Jr. (1972). Functional aspects of compensatory renal growth after ischemic injury. *Invest Urol* **10**(3), 235-238
102. Claesson, I., et al. (1981). Compensatory kidney growth in children with urinary tract infection and unilateral renal scarring: an epidemiologic study. *Kidney Int* **20**(6), 759-764
103. Fine, L. G., Norman, J. T. (1992). Renal growth responses to acute and chronic injury: routes to therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* **2**(Suppl 10), 206-211
104. Fleck, C., Bräunlich, H. (1984). Kidney function after unilateral nephrectomy. *Exp Pathol* **25**(1), 3-18

105. Johnson, H. A., Roman, J. M. V. (1966). Compensatory renal enlargement: hypertrophy versus hyperplasia. *Am J Pathol* **49**(1), 1-13
106. Hummel, C. S., et al. (2012). Structural selectivity of human SGLT inhibitors. *Am J Physiol Cell Physiol* **302**(2), C373-C382
107. Paulson, D. F., Fraley, E. E. (1973). Compensatory renal growth after unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* **4**(1), 22-27
108. Masereel, B., Pochet, L., Laeckmann, D. (2003). An overview of inhibitors of Na^+/H^+ exchanger. *Eur J Med Chem* **38**(6), 547-554
109. Kaufman, J. M., Hardy, R., Hayslett, J. P. (1975). Age-dependent characteristics of compensatory renal growth. *Kidney Int* **8**(1), 21-26
110. Seyer-Hansen, K. (1976). Renal hypertrophy in streptozotocin-diabetic rats. *Clin Sci Mol Med* **51**(6), 551-555
111. Santos, L. S., et al. (2006). Surgical reduction of the renal mass in rats. Morphologic and functional analysis on the remnant kidney. *Acta Cir Bras* **21**(4), 252-257
112. Banchaabouchi, M. A., et al. (2001). Biochemical, histological and behavioral consequences of nephrectomy in young and aged mice. *Nephron* **89**(1), 90-100
113. Kaufman, J. M., et al. (1974). Compensatory adaptation of structure and function following progressive renal ablation. *Kidney Int* **6**(1), 10-17
114. Flyvbjerg, A., et al. (1999). Compensatory renal growth in uninephrectomized adult mice is growth hormone dependent. *Kidney Int* **56**(6), 2048-2054
115. Natesan, S., Reddy, S. R. (2001). Compensatory changes in enzymes of arginine metabolism during renal hypertrophy in mice. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **130**(4), 585-595
116. Harris, D. C. Chan, L., Schrier, R. W. (1988). Remnant kidney hypermetabolism and progression of chronic renal failure. *Am J Physiol* **254**(2 Pt 2), F267-F276
117. Hayslett, J. P., Kashgarian, M., Epstein, F. H. (1968). Functional correlates of compensatory renal hypertrophy. *J Clin Invest* **47**(4), 774-799
118. Deetjen, P., Kramer, K. (1961). Die Abhängigkeit des O_2 -Verbrauchs des Niere von des Na Rückresorption. *Arch Gesamte Physiol Mens Tiere* **273**, 636-659
119. Katz, A. I., Epstein, F. H. (1967). Relation of glomerular filtration rate and sodium reabsorption to kidney size in compensatory renal hypertrophy. *Yale J Biol Med* **40**(3), 222-230
120. Salehmoghaddam, S., et al. (1985). Hypertrophy of basolateral Na-K pump activity in the proximal tubule of the remnant kidney. *Lab Invest* **53**(4), 443-452
121. Coresh, J., et al. (2007). Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA* **298**(17), 2038-2047

122. Mogensen, C. E., Christensen, C. K., Vittinghus, E. (1983). The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes* **32**(Suppl 2), 64-78
123. Terada, Y., et al. (1999). Cell cycle inhibitors (p27^{Kip1} and p21^{Cip1}) cause hypertrophy in LLC-PK₁ cells. *Kidney Int* **56**(2), 494-501
124. Franch, H. A., et al. (1995). Involvement of pRB family in TGF β -dependent epithelial cell hypertrophy. *J Cell Biol* **129**(1), 245-254
125. Park, S. K., et al. (1997). Temporal expressions of cyclins and cyclin dependent kinases during renal development and compensatory growth. *Kidney Int* **51**(3), 762-769
126. Fisher, D. A., Salido, E. C., Barajas, L. (1989). Epidermal growth factor and the kidney. *Annu Rev Physiol* **51**, 67-80
127. Monkawa, T., et al. (2002). The hypertrophic effect of Transforming Growth Factor- β is reduced in the absence of cyclin-dependent-kinase-inhibitors p21 und p27. *J Am Soc Nephrol* **13**(5), 1172-1178
128. Wolf, G. (1999). Molecular mechanisms of renal hypertrophy: Role of p27^{Kip1}. *Kidney Int* **56**(4), 1262-1265
129. Mendley, S. R., Toback, F. G. (1988). Autocrine and paracrine regulation of kidney epithelial cell growth. *Annu Rev Physiol* **51**, 33-50
130. Peñaranda, C., et al. (1996). Hypertrophy of rabbit proximal tubule cells is associated with overexpression of TGF β . *Life Sci* **59**(21), 1773-1782
131. Laiho, M., et al. (1990). Growth inhibition by TGF-beta linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. *Cell* **62**(1), 175-185
132. Wolf, G., Stahl, R. A. (1996). Angiotensin II-stimulated hypertrophy of LLC-PK₁ cells depends on the induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1}. *Kidney Int* **50**(6), 2112-2119
133. Wolf, G., et al. (2001). High glucose-induced hypertrophy of mesangial cells requires p27^{Kip1}, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Am J Pathol* **158**(3), 1091-1100
134. Weintraub, S. J., Prater, C. A., Dean, D. C. (1992). Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature* **358**(6383), 259-261
135. Shankland, S. J. (1997). Cell-cycle control and renal disease. *Kidney Int* **52**(2), 294-308
136. Reynisdóttir, I., et al. (1995). Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev* **9**(15), 1831-1845
137. Choi, M. E., et al. (1993). Rat mesangial cell hypertrophy in response to transforming growth factor- β 1. *Kidney Int* **44**(5), 948-958
138. Gronboek, H., et al. (1997). Effect of graded renal ablation on kidney and serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding proteins in rats: Relation to compensatory renal growth. *Metabolism* **46**(1), 29-35

139. Hammerman, M. R., Miller, S. B. (1993). The growth hormone insulin-like growth factor axis in kidney revisited. *Am J Physiol* **265**(1 Pt 2), F1-F14
140. Fagin, J. A., Melmed, S. (1987). Relative increase in insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid levels in compensatory renal hypertrophy. *Endocrinology* **120**(2), 718-724
141. Fervenza, F. C., et al. (1999). Intrarenal insulin-like growth factor-1 axis after unilateral nephrectomy in rat. *J Am Soc Nephrol* **10**(1), 43-50
142. Lajara, R., et al. (1989). Dual regulation of insulin-like growth factor I expression during renal hypertrophy. *Am J Physiol* **257**(2 Pt 2), F252-F261
143. Evan, A. P., et al. (1995). Analysis of insulin-like growth factors (IGF)-I, and -II, type II IGF receptor and IGF-binding protein-2 mRNA and peptide levels in normal and nephrectomized rat kidney. *Kidney Int* **48**(5), 1517-1529
144. Haylor, J., et al. (2000). JB3, an IGF-I receptor antagonist, inhibits early renal growth in diabetic and uninephrectomized rats. *J Am Soc Nephrol* **11**(11), 2027-2035
145. Joannidis, M., et al. (1994). Regional expression of hepatocyte growth factor/c-met in experimental renal hypertrophy and hyperplasia. *Am J Physiol* **267**(2 Pt 2), F231-F236
146. Fine, L. G., Hammerman, M. R., Abboud, H. E. (1992). Evolving role of growth factors in the renal response to acute and chronic disease. *J Am Soc Nephrol* **2**(7), 1163-1170
147. Hammerman, M. R., O'Shea, M., Miller, S. B. (1993). Role of growth factors in regulation of renal growth. *Annu Rev Physiol* **55**, 305-321
148. Chen, J.-K., et al. (2005). Role of mammalian target of rapamycin signaling in compensatory renal hypertrophy. *J Am Soc Nephrol* **16**(5), 1384-1391
149. Miller, S. B., et al. (1992). Increased distal nephron EGF content and altered distribution of peptide in compensatory renal hypertrophy. *Am J Physiol* **262**(6 Pt 2), F1032-F1038
150. Ishibashi, K., et al. (1992). Expressions of receptor gene for hepatocyte growth factor in kidney after unilateral nephrectomy and renal injury. *Biochem Biophys Res Commun* **187**(3), 1454-1459
151. Gettes, D. R., Faber, J. E., Velandia, N. B. (1986). Renal innervation is not required for compensatory renal growth in the rat. *J Auton Nerv Syst* **16**(2), 101-108
152. Dicker, S. E., Greenbaum, A. L., Morris, C. A. (1977). Compensatory renal hypertrophy in hypophysectomized rats. *J Physiol* **273**(1), 241-253
153. Preuss, H. G. (1983). Compensatory renal growth symposium: An introduction. *Kidney Int* **23**, 571-574
154. Austin, H., Goldin, H., Preuss, H. G. (1981). Humoral regulation of renal growth. Evidence for and against the presence of a circulating renotropic factor. *Nephron* **27**(4-5), 163-170
155. Haramati, A., Lumpkin, M. D., Mulroney, S. E. (1994). Early increase in pulsatile growth hormone release after unilateral nephrectomy in adult rats. *Am J Physiol* **266**(4 Pt 2), F628-F632

156. Hutson, J. M., et al. (1981). Compensatory renal growth in the mouse. II. The effect of growth hormone deficiency. *Pediatr Res* **15**(10), 1375-1380
157. Wang, X., Proud, C. G. (2006). The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology (Bethesda)* **21**, 362-369
158. Mistry, S., et al. (2000). The expression and secretion of atrial natriuretic factor and brain natriuretic peptide by rat proximal tubular cells. *Biochem Pharmacol* **59**(7), 783-790
159. Kumar, A. M., Gupta, R. K., Spitzer, A. (1988). Intracellular sodium in proximal tubules of diabetic rats. Role of glucose. *Kidney Int* **33**(4), 792-797
160. Astoin, M., Altman, J. (1976). [Early renal hemodynamic modifications following the ablation of the controlateral kidney]. *CR Seances Soc Biol Fil* **170**(4), 734-738
161. Ewald, J., Aurell, M. (1975). Renal function studies after donor nephrectomy. *Scand J Urol Nephrol* (**29** Suppl), 121-124
162. Potter, D. E., et al. (1974). Early responses of glomerular filtration rate to unilateral nephrectomy. *Kidney Int* **5**(2), 131-136
163. Krohn, A. G., et al. (1970). Compensatory renal hypertrophy: the role of immediate vascular changes in its production. *J Urol* **103**(5), 564-568
164. Harris, R. H., Best, C. F. (1977). Circulatory retention of urinary factors as a stimulus to renal growth. *Kidney Int* **12**(5), 305-312
165. Dicker, S. E., Shirley, D. G. (1971). Mechanism of compensatory renal hypertrophy. *J Physiol* **219**(3), 507-523
166. Sacerdotti, C. (1896). Ueber die compensatorische Hypertrophie der Nieren. *Virchows Arch Pathol Anat* **146**, 267-297
167. Arataki, M. (1925). Experimental researches on the compensatory enlargement of the surviving kidney after unilateral nephrectomy (albino rat). *Am J Anat* **36**, 437-450
168. Allison, M. E., Wilson, C. B., Gottschalk, C. W. (1974). Pathophysiology of experimental glomerulonephritis in rats. *J Clin Invest* **53**(5), 1402-1423
169. Ichikawa, I., et al. (1982). Mechanism of glomerulotubular balance in the setting of heterogeneous glomerular injury. *J Clin Invest* **69**(1), 185-198
170. Tse, C. M., et al. (1992). Cloning and sequencing of a rabbit cDNA encoding an intestinal and kidney-specific Na⁺/H⁺ exchanger isoform (NHE-3). *J Biol Chem* **267**(13), 9340-9346
171. Preuss, H. G., Terryi, E. F., Keller, A. I. (1970). Renotrophic factor(s) in plasma from uninephrectomized rats. *Nephron* **7**(5), 459-470
172. Martel-Pelletier, J., Bergeron, M. (1977). Compensatory renal hypertrophy. I. Evidence for a factor of renal origin inhibiting DNA synthesis. *Can J Physiol Pharmacol* **55**(4), 839-847
173. de Bold, A. J., et al. (2001). A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *J Am Soc Nephrol* **13**(2), 403-409; reprinted from *Life Sci* (1981) **28**(1), 89-94

174. Sudoh, T., et al. (1988). A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* **332**(6159), 78-81
175. Sudoh, T., et al. (1990). C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* **168**(2), 863-870
176. Schweitz, H., et al. (1992). A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *J Biol Chem* **267**(20), 13928-13932
177. Schulz-Knappe, P., et al. (1988). Isolation and structural analysis of „urodilatin“, a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine. *Klin Wochenschr* **66**(17), 752-759
178. Misono, K. S., et al. (1984). Rat atrial natriuretic factor: isolation, structure and biological activities of four major peptides. *Biochem Biophys Res Commun* **123**(2), 444-451
179. Schreiber, A. (2012). Die Mechanismen der kompensatorischen renalen Hypertrophie. Universität Regensburg, Dissertation
180. Wolf, G., et al. (1992). Angiotensin II-induced proliferation of cultured murine mesangial cells: Inhibitory role of atrial natriuretic peptide. *J Am Soc Nephrol* **3**(6), 1270-1278
181. Herten, M., et al. (1998). The renal natriuretic peptide urodilatin is present in human kidney. *Nephrol Dial Transplant* **13**(10), 2529-2535
182. Gunning, M., Brenner, B. M. (1993). Urodilatin: a potent natriuretic peptide of renal origin. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **2**(6), 857-862
183. Ramirez, G., et al. (1992). Immunocytochemical localization of proANF 1-30, proANF 31-67, and atrial natriuretic factor in the kidney. *Kidney Int* **41**(2), 334-341
184. Vesely, D. L., et al. (1998). Atrial natriuretic peptide increases urodilatin in the circulation. *Am J Nephrol* **18**(3), 204-213
185. Totsune, K., et al. (1998). Upregulation of atrial natriuretic peptide gene expression in remnant kidney of rats with reduced renal mass. *J Am Soc Nephrol* **9**(9), 1613-1619
186. Gower, W. R. Jr, et al. (2003). Enhanced atrial natriuretic prohormone gene expression in cardiac and extracardiac tissues of type II diabetic Goto-Kakizaki rat. *Mol Cell Biochem* **252**(1-2), 263-271
187. McGrath, M. F., de Bold, A. J. (2005). Determinants of natriuretic peptide gene expression. *Peptides* **26**(6), 933-943
188. Gardner, D. G., et al. (1986). Extra-atrial expression of the gene for atrial natriuretic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**(18), 6697-6701
189. Vesely, D. L., Palmer, P. A., Giordano, A. T. (1992). Atrial natriuretic factor prohormone peptides are present in a variety of tissues. *Peptides* **13**(1), 165-170
190. Forssmann, W. G., Richter, R., Meyer, M. (1998). The endocrine heart and natriuretic peptides: histochemistry, cell biology, and functional aspects of the renal urodilatin system. *Histochem Cell Biol* **110**(4), 335-357

191. Porter, J. G., et al. (1989). Cloning of a cDNA encoding porcine brain natriuretic peptide. *J Biol Chem* **264**(12), 6689-6692
192. Kuhn, M. (2003). Structure, Regulation, and Function of Mammalian Membrane Guanylyl Cyclase Receptors, With a Focus on Guanylyl Cyclase-A. *Circ Res* **93**(8), 700-709
193. Ruskoaho, H. (1992). Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism. *Pharmacol Rev* **44**(4), 479-602
194. Matsubara, H., et al. (1987). Effects of steroid and thyroid hormones on synthesis of atrial natriuretic peptide by cultured atrial myocytes of rat. *Biochem Biophys Res Commun* **145**(1), 336-343
195. Schiebinger, R. J., Baker, M. Z., Linden, J. (1987). Effect of adrenergic and muscarinic cholinergic agonists on atrial natriuretic peptide secretion by isolated rat atria. Potential role of the autonomic nervous system in modulating atrial natriuretic peptide secretion. *J Clin Invest* **80**(6), 1687-1691
196. Bruneau, B. G., de Bold, A. J. (1994). Selective changes in natriuretic peptide and early response gene expression in isolated rat atria following stimulation by stretch or endothelin-1. *Cardiovasc Res* **28**(10), 1519-1525
197. Focaccio, A., et al. (1993). Angiotensin II directly stimulates release of atrial natriuretic factor in isolated rabbit hearts. *Circulation* **87**(1), 192-198
198. Maack, T. J., et al. (1993). Functional properties of atrial natriuretic factor receptors. *Semin Nephrol* **13**(1), 50-60
199. Anand-Srivastava, M. B., Trachte, G. J. (1993). Atrial natriuretic factor receptors and signal transduction mechanisms. *Pharmacol Rev* **45**(4), 455-497
200. Anand-Srivastava, M. B., Sairam, M. R., Cantim, M. (1990). Ring-deleted analogs of atrial natriuretic factor inhibit adenylate cyclase/cAMP system. Possible coupling of clearance atrial natriuretic factor receptors to adenylate cyclase/cAMP signal transduction system. *J Biol Chem* **265**(15), 8566-8572
201. Misono, K. S., et al. (1984). Rat atrial natriuretic factor: complete amino acid sequence and disulfide linkage essential for biological activity. *Biochem Biophys Res Commun* **119**(2), 524-529
202. Kenny, A. J., Bourne, A., Ingram, J. (1993). Hydrolysis of human and pig brain natriuretic peptides, urodilatin, C-type natriuretic peptide and some C-receptor ligands by endopeptidase-24.11. *Biochem J* **291**(Pt 1), 83-88
203. Watanabe, Y., et al. (1997). Comparison of the hydrolysis of the three types of natriuretic peptides by human kidney neutral endopeptidase 24.11. *Biochem Mol Med* **61**(1), 47-51
204. Kanazawa, M., Johnston, C. I. (1991). Distribution and inhibition of neutral metalloendopeptidase (NEP) (EC 3.4.24.11), the major degradative enzyme for atrial natriuretic peptide, in the rat kidney. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **18**(6), 449-453
205. Kanazawa, M., et al. (1992). Localization and characterization of neutral metalloendopeptidase (EC 3.4.24.11), the degradative enzyme for atrial natriuretic peptide, in rat kidney using a radioiodinated neutral metalloendopeptidase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* **261**(3), 1231-1237

206. Wilkins, M. R., Unwin, R. J., Kenny, A. J. (1993). Endopeptidase-24.11 and its inhibitors: potential therapeutic agents for edematous disorders and hypertension. *Kidney Int* **43**(2), 273-285
207. Kenny, A. J., Stephenson, S. L. (1988). Role of endopeptidase-24.11 in the inactivation of atrial natriuretic peptide. *FEBS Lett* **232**, 1-8
208. Abassi, Z. A., et al. (1992). Pharmacokinetics of ANF and urodilatin during cANF receptor blockade and neutral endopeptidase inhibition. *Am J Physiol* **263**(5 Pt 1), E870-E876
209. Pankow, K., et al. (2007). Successive Action of Meprin A and Neprilysin Catabolizes B-Type Natriuretic Peptide. *Circ Res* **101**(9), 875-882
210. Matsukawa, N., et al. (1999). The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(13), 7403-7408
211. Suga, S., et al. (1992). Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* **130**(1), 229-239
212. Smith, M. W., et al. (2000). Delayed metabolism of human brain natriuretic peptide reflects resistance to neutral endopeptidase. *J Endocrinol* **167**(2), 239-246
213. Potter, L. R. (2005). Domain analysis of human transmembrane guanylyl cyclase receptors: implications for regulation. *Front Biosci* **10**, 1205-1220
214. Chang, C. H., et al. (1990). Characterization of ATP-stimulated guanylate cyclase activation in rat lung membranes. *Biochim Biophys Acta* **1052**(1), 159-165
215. Kurose, H., Inagami, T., Ui, M. (1987). Participation of adenosine 5'-triphosphate in the activation of membrane-bound guanylate cyclase by the atrial natriuretic factor. *FEBS Lett* **219**(2), 375-379
216. Chinkers, M., Singh, S., Garbers, D. L. (1991). Adenine nucleotides are required for activation of rat atrial natriuretic peptide receptor/guanylyl cyclase expressed in a baculovirus system. *J Biol Chem* **266**(7), 4088-4093
217. Marala, R. B., Sitaramayya, A., Sharma, R. K. (1991). Dual regulation of atrial natriuretic factor-dependent guanylate cyclase activity by ATP. *FEBS Lett* **281**(1-2), 73-76
218. Kaupp, U. B., Seifert, R. (2002). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* **82**(3), 769-824
219. Yuan, K., et al. (2009). Osmoregulation of natriuretic peptide receptors in bromoethylamine-treated rat kidney. *Peptides* **30**(6), 1137-1143
220. Schlossmann, J., Feil, R., Hofmann, F. (2005). Insights into cGMP signalling derived from cGMP kinase knockout mice. *Front Biosci* **10**, 1279-1289
221. Beavo, J. A. (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* **75**(4), 725-748

222. Nagase, M., et al. (1997). Tissue distribution and localization of natriuretic peptide receptor subtypes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* **15**(11), 1235-1243
223. Potter, L. R., Hunter, T. (1998). Phosphorylation of the kinase homology domain is essential for activation of the A-type natriuretic peptide receptor. *Mol Cell Biol* **18**(4), 2164-2172
224. Pandey, K. N., et al. (2002). Ligand-regulated internalization, trafficking, and down-regulation of guanylyl cyclase/atrial natriuretic peptide receptor-A in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem* **277**(7), 4618-4627
225. Pandey, K. N., et al. (2000). Functional domains and expression of truncated atrial natriuretic peptide receptor-A: the carboxyl-terminal regions direct the receptor internalization and sequestration in COS-7 cells. *Mol Pharmacol* **57**(2), 259-267
226. Pandey, K. N. (1993). Stoichiometric analysis of internalization, recycling, and redistribution of photoaffinity-labeled guanylate cyclase/atrial natriuretic factor receptors in cultured murine Leydig tumor cells. *J Biol Chem* **268**(6), 4382-4390
227. Jewett, J. R., et al. (1993). Hormonal induction of low affinity receptor guanylyl cyclase. *EMBO J* **12**(2), 769-777
228. Potter, L. R., Garbers, D. L. (1992). Dephosphorylation of the guanylyl cyclase-A receptor causes desensitization. *J Biol Chem* **267**(21), 14531-14534
229. Katafuchi, T., et al. (1992). Modulation by NaCl of atrial natriuretic peptide receptor levels and cyclic GMP responsiveness to atrial natriuretic peptide of cultured vascular endothelial cells. *J Biol Chem* **267**(11), 7624-7629
230. Potter, L. R., Garbers, D. L. (1994). Protein kinase C-dependent desensitization of the atrial natriuretic peptide receptor is mediated by dephosphorylation. *J Biol Chem* **269**(20), 14636-14642
231. Haneda, M., et al. (1991). Dual mechanism of angiotensin II inhibits ANP-induced mesangial cGMP accumulation. *Kidney Int* **40**(2), 188-194
232. Garg, R., Pandey, K. N. (2005). Regulation of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A gene expression. *Peptides* **26**(6), 1009-1023
233. Cao, L., Wu, J., Gardner, D. G. (1995). Atrial natriuretic peptide suppresses the transcription of its guanylyl cyclase-linked receptor. *J Biol Chem* **270**(42), 24891-24897
234. Roubert, P., et al. (1987). Down-regulation of atrial natriuretic factor receptors and correlation with cGMP stimulation in rat cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **148**(1), 61-67
235. Kato, J., Lanier-Smith, K. L., Currie, M. G. (1991). Cyclic GMP down-regulates atrial natriuretic peptide receptors on cultured vascular endothelial cells. *J Biol Chem* **266**(22), 14681-14685
236. Schreier, B., et al. (2008). The heart communicates with the endothelium through the guanylyl cyclase-A receptor: Acute handling of intravascular volume in response to volume expansion. *Endocrinology* **149**(8), 4193-4199

237. Wijeyaratne, C. N., Moul, P. J. (1993). The effect of α human atrial natriuretic peptide on plasma volume and vascular permeability in normotensive subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **76**(2), 343-346
238. Sabrane, K., et al. (2005). Vascular endothelium is critically involved in the hypotensive and hypovolemic actions of atrial natriuretic peptide. *J Clin Invest* **115**(6), 1666-1674
239. Holtwick, R., et al. (2002). Smooth muscle-selective deletion of guanylyl cyclase-A prevents the acute but not chronic effects of ANP on blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**(10), 7142-7147
240. Burrell, L. M., Lambert, H. J., Baylis, P. H. (1991). Effect of atrial natriuretic peptide on thirst and arginine vasopressin release in humans. *Am J Physiol* **260**(3 Pt 2), R475-R479
241. Blackburn, R. E., et al. (1995). Central oxytocin and ANP receptors mediate osmotic inhibition of salt appetite in rats. *Am J Physiol* **269**(2 Pt 2), R245-R251
242. Steele, M. K., et al. (1991). Interactions between ANP and ANG II in regulating blood pressure and sympathetic outflow. *Am J Physiol* **260**(6 Pt 2), R1145-R1151
243. Cody, R. J., et al. (1986). Atrial natriuretic factor in normal subjects and heart failure patients. Plasma levels and renal, hormonal, and hemodynamic responses to peptide infusion. *J Clin Invest* **78**(5), 1362-1374
244. La Villa, G., et al. (1994). Cardiovascular and Renal Effects of Low Dose Brain Natriuretic Peptide Infusion in Man. *J Clin Endocrinol Metab* **78**(5), 1166-1171
245. Jensen, K. T., Carstens, J., Pedersen, E. B. (1998). Effect of BNP on renal hemodynamics, tubular function and vasoactive hormones in humans. *Am J Physiol* **274**(1 Pt 2), F63-F72
246. Marin-Grez, M., Fleming, J. T., Steinhausen, M. (1986). Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature* **324**(6096), 473-476
247. Harris, P. J., Thomas, D., Morgan, T. O. (1987). Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption. *Nature* **326**(6114), 697-698
248. Zeidel, M. L. (1990). Renal actions of atrial natriuretic peptide: regulation of collecting duct sodium and water transport. *Annu Rev Physiol* **52**, 747-759
249. Light, D. B., Corbin, J. D., Stanton, B. A. (1990). Dual ion-channel regulation by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase. *Nature* **344**(6264), 336-339
250. Saxenhofer, H., et al. (1990). Urodilatin, a natriuretic factor from kidneys, can modify renal and cardiovascular function in men. *Am J Physiol* **259**(5 Pt 2), F832-F838
251. Kudo, T., Baird, A. (1984). Inhibition of aldosterone production in the adrenal glomerulosa by atrial natriuretic factor. *Nature* **312**(5996), 756-757
252. De Léan, A., et al. (1984). Characterization of specific receptors for atrial natriuretic factor in bovine adrenal zona glomerulosa. *Life Sci* **35**(23), 2311-2318

253. Kurtz, A., et al. (1986). Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cGMP-mediated process. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**(13), 4769-4773
254. John, S. W., et al. (1996). Blood pressure and fluid-electrolyte balance in mice with reduced or absent ANP. *Am J Physiol* **271**(1 Pt 2), R109-R114
255. Lopez, M. J., et al. (1995). Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature* **378**(6552), 65-68
256. Oliver, P. M., et al. (1997). Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**(26), 14730-14735
257. Steinhilper, M. E., Cochrane, K. L., Field, L. J. (1990). Hypotension in transgenic mice expressing atrial natriuretic factor fusion genes. *Hypertension* **16**(3), 301-307
258. Ogawa, Y., et al. (1994). Molecular cloning of the complementary DNA and gene that encode mouse brain natriuretic peptide and generation of transgenic mice that overexpress the brain natriuretic peptide gene. *J Clin Invest* **93**(5), 1911-1921
259. Nishida, Y., et al. (1990). Effects of brain natriuretic peptide on hemodynamics and renal function in dogs. *Jpn J Physiol* **40**(4), 531-540
260. Tamura, N., et al. (2000). Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**(8), 4239-4244
261. Cao, L., Gardner, D. G. (1995). Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts. *Hypertension* **25**(2), 227-234
262. Itoh, H., et al. (1992). Atrial natriuretic polypeptide as a novel antigrowth factor of endothelial cells. *Hypertension* **19**(6 Pt 2), 758-761
263. Appel, R. G. (1992). Growth-regulatory properties of atrial natriuretic factor. *Am J Physiol* **262**(6 Pt 2), F911-F918
264. Lopez, M. J., Garbers, D. L., Kuhn, M. (1997). The guanylyl cyclase-deficient mouse defines differential pathways of natriuretic peptide signaling. *J Biol Chem* **272**(37), 23064-23068
265. Dillingham, M. A., Anderson, R. J. (1986). Inhibition of vasopressin action by atrial natriuretic factor. *Science* **231**(4745), 1572-1573
266. Nakagawa, M., et al. (2001). Monoclonal antibody against brain natriuretic peptide and characterization of brain natriuretic peptide-transgenic mice. *J Hypertens* **19**(3), 475-483
267. Ogawa, Y., Nakao, K. (1995). *Pathophysiology, Diagnosis and Management*, eds. Laragh, J. H., Brenner, B. M. (Raven, New York). Hypertension, 833-840
268. Mukoyama, M., et al. (1991). Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. *J Clin Invest* **87**(4), 1402-1412
269. Morita, E., et al. (1993). Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* **88**(1), 82-91

270. Nowinski, W. W. (1969). Early history of renal hypertrophy. In: Compensatory Renal Hypertrophy, edited by Nowinski W. W. and Goss R. J. New York and London. Academic Press, 1-8
271. García-Ocaña, A., Peñaranda, C., Esbrit, P. (1996). Comparison of antiproliferative effects of atrial natriuretic peptide and transforming growth factor β on rabbit kidney proximal tubule cells. *Life Sci* **58**(3), 251-258
272. Appel, R. G. (1988). Growth inhibitory activity of atrial natriuretic factor in rat glomerular mesangial cells. *FEBS Lett* **238**(1), 135-138
273. Appel, R. G. (1990). Mechanism of atrial natriuretic factor-induced inhibition of rat mesangial cell mitogenesis. *Am J Physiol* **259**(3 Pt 1), E312-E318
274. Cahill, P. A., Hassid, A. (1994). ANF-C-receptor-mediated inhibition of aortic smooth muscle cell proliferation and thymidine kinase activity. *Am J Physiol* **266**(1 Pt 2), R194-R203
275. Abell, T. J., et al. (1989). Atrial natriuretic factor inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells stimulated by platelet-derived growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* **160**(3), 1392-1396
276. Vollmar, A. M., Schmidt, K. N., Schulz, R. (1996). Natriuretic peptide receptors on rat thymocytes: Inhibition of proliferation by atrial natriuretic peptide. *Endocrinology* **137**(5), 1706-1713
277. Hutchinson, H. G., et al. (1997). Mechanisms of natriuretic-peptide-induced growth inhibition of vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* **35**(1), 158-167
278. Levin, E. R., Frank, H. J. L. (1991). Natriuretic peptides inhibit rat astroglial proliferation: mediation by C receptor. *Am J Physiol* **261**(2 Pt 2), R453-R457
279. Ganz, M. B., et al. (1988). Arginine vasopressin promotes growth of rat glomerular mesangial cells in culture. *Am J Physiol* **255**(5 Pt 2), F898-F906
280. Itoh, H., Pratt, R. E., Dzau, V. J. (1990). Atrial natriuretic polypeptide inhibits hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* **86**(5), 1690-1697
281. Gracheva, L. A., et al. (1991). [Effects of atrial natriuretic factor on proliferative response and natural cytotoxicity of human lymphocytes.] *Biull Eksp Biol Med* **111**(5), 518-520
282. Sporn, M. B., Roberts, A. B. (1988). Peptide growth factors are multifunctional. *Nature* **332**(6161), 217-219
283. Gao, P., et al. (2009). NPRA-mediated suppression of AngII-induced ROS production contribute to the antiproliferative effects of B-type natriuretic peptide in VSMC. *Mol Cell Biochem* **324**(1-2), 165-172
284. Schirger, J. A., et al. (2000). Vascular actions of brain natriuretic peptide: Modulation by atherosclerosis and neutral endopeptidase inhibition. *J Am Coll Cardiol* **35**(3), 796-801
285. Mattingly, M. T., et al. (1994). Potentiation of the renal actions of canine brain natriuretic peptide by neutral endopeptidase inhibition. *Am J Hypertens* **7**, 14A

286. Wolf, G., Neilson, E. G. (1993). Angiotensin II as a renal growth factor. *J Am Soc Nephrol* **3**(9), 1531-1540
287. Wolf, G., Neilson, E. G. (1990). Angiotensin II induces cellular hypertrophy in cultured murine proximal tubular cells. *Am J Physiol* **259**(5 Pt 2), F768-F777
288. Wolf, G., Killen, P. D., Neilson, E. G. (1991). Intracellular signaling of transcription and secretion of type IV collagen after angiotensin II-induced cellular hypertrophy in cultured proximal tubular cells. *Cell Regul* **2**(3), 219-227
289. Harris, R. C. (1992). Regulation of S6 kinase activity in renal proximal tubule. *Am J Physiol* **263**(1 Pt 2), F127-F134
290. Essig, M., Friedlander, G. (2003). Tubular shear stress and phenotype of renal proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol* **14**(Suppl 1), 33-35
291. Essig, M., Friedlander, G. (2003). Shear-stress-responsive signal transduction mechanisms in renal proximal tubule cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **12**(1), 31-34
292. Drexler, K. (2010). Regulation intrarenaler Wachstumsprogramme bei der kompensatorischen renalen Hypertrophie. Universität Regensburg, Diplomarbeit
293. Fong, D., et al. (2014). Compensatory responses to nephron deficiency: Adaptive or maladaptive? *Nephrology (Carlton)* **19**(3), 119-128
294. Thellin, O., et al. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* **75**(2-3), 291-295
295. Lisowski, P., et al. (2008). Evaluation of reference genes for studies of gene expression in the bovine liver, kidney, pituitary, and thyroid. *J Appl Genet* **49**(4), 367-372
296. Cappelli, K., et al. (2008). Exercise induced stress in horses: Selection of the most stable reference genes for quantitative RT-PCR normalization. *BMC Mol Biol* **9**, 49
297. Huggett, J., et al. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* **6**(4), 279-284
298. Marchal, E., et al. (2013). Sequencing and validation of housekeeping genes for quantitative real-time PCR during the gonadotrophic cycle of *Diploptera punctata*. *BMC Res Notes* **6**, 237
299. Schmittgen, T. D., Zakrajsek, B. A. (2000). Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* **46**(1-2), 69-81
300. Andersen, C. L., Jensen, J. L., Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* **64**(15), 5245-5250
301. Jain, M., et al. (2006). Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* **345**(2), 646-651

302. Radonić, A., et al. (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* **313**(4), 856-862
303. Huang, H. C., Preisig, P. A. (2000). G₁ kinases and transforming growth factor-beta signaling are associated with a growth pattern switch in diabetes-induced renal growth. *Kidney Int* **58**(1), 162-172
304. Franch, H. A., et al. (1995). Involvement of pRB family in TGF beta-dependent epithelial cell hypertrophy. *J Cell Biol* **129**(1), 245-254
305. Lundberg, A. S., Weinberg, R. A. (1998). Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* **18**(2), 753-761
306. Koller, K. J., Lipari, M. T., Goeddel, D. V. (1993). Proper glycosylation and phosphorylation of the type A natriuretic peptide receptor are required for hormone-stimulated guanylyl cyclase activity. *J Biol Chem* **268**(8), 5997-6003
307. Nadasdy, T., et al. (1994). Proliferative activity of intrinsic cell populations in the normal human kidney. *J Am Soc Nephrol* **4**(12), 2032-2039
308. Thomasova, D., Anders, H. J. (2014). Cell cycle control in the kidney. *Nephrol Dial Transplant*, 1-9
309. Gerdes, J., et al. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* **133**(4), 1710-1715
310. Scholzen, T., Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol* **182**(3), 311-322
311. Nagahara, H., et al. (1999). Transforming growth factor beta targeted inactivation of cyclin E: cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) complexes by inhibition of Cdk2 activating kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(26), 14961-14966
312. Preisig, P. (1999). A cell cycle-dependent mechanism of renal tubule epithelial cell hypertrophy. *Kidney Int* **56**(4), 1193-1198
313. Sherr, C. J. (1994). G₁ phase progression: Cycling on cue. *Cell* **79**(4), 551-555
314. Morgan, D. O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* **374**(6518), 131-134
315. Baserga, R. (1981). The cell cycle. *N Engl J Med* **304**(8), 453-459
316. Prescott, L. F. (1966). The normal urinary excretion rates of renal tubular cells, leukocytes, and red blood cells. *Clin Sci* **31**(3), 425-435
317. Cao, L., et al. (1998). Ligand-dependent regulation of NPR-A gene expression in inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol* **275**(1 Pt 2), F119-125
318. Nussenzweig, D. R., Lewicki, J. A., Maack, T. (1990). Cellular mechanisms of the clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factor. *J Biol Chem* **265**(34), 20952-20958
319. Flora, D. R., Potter, L. R. (2010). Prolonged atrial natriuretic peptide exposure stimulates guanylyl cyclase-a degradation. *Endocrinology* **151**(6), 2769-2776

VII. Abbildungsverzeichnis

Einleitung:

Abb. 1.1:	
Anatomischer Aufbau der Niere (links)	
Schematische Darstellung der Nephronabschnitte (rechts)	8
Abb. 1.2:	
Schematische Darstellung des Glomerulus (a+b), EM-Aufnahme der „Blut-Harn-Schranke“ (c)	10
Abb. 1.3:	
Zellzyklus - Steuerung des G ₁ /S-Übergangs	16
Abb. 1.4:	
Zellzyklusabhängige kompensatorische renale Hypertrophie	17
Abb. 1.5:	
Protein/DNA-Verhältnis von PTC statisch bzw. nach Perfusion (24 h, 1 mm/s): Wildtyp-Zellen vs. GC-A-Knockout-Zellen (Relativwerte)	21
Abb. 1.6:	
Aminosäuresequenzen der natriuretischen Peptide ANP, Urodilatin und BNP mit eingezeichneten Disulfidbrücken	22
Abb. 1.7:	
Gemeinsamer Syntheseweg des biologisch aktiven ANPs sowie des Urodilatins	24
Abb. 1.8:	
Schematische Darstellung der Angriffspunkte von ANP an der Zielzelle (ebenso gültig für BNP) sowie der Signaltransduktion	29
Abb. 1.9:	
Stimulation der Diurese und Natriurese durch Aktivierung des NPR-A	31
Abb. 1.10:	
Gegenüberstellung in vivo-Situation - in vitro-Modell	33

Methoden:

Abb. 2.1:	
Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme zeigt morphologisches Erscheinungsmuster von konfluenten LLC-PK ₁ -Zellen	36
Abb. 2.2:	
Auftrennung der verschiedenen Zelltypen im Percollgradienten entsprechend ihrer Dichte .	39
Abb. 2.3:	
Aufnahmen frisch isolierter proximaler Tubuli sowie konfluenter proximaler Tubuluszellen aus der Mäuseniere	41
Abb. 2.4:	
In vitro-Flussmodell - Versuchsaufbau zur Superfusion proximaler Tubuluszellen	46
Abb. 2.5:	
In vitro-Flussmodell - Schemazeichnung	46
Abb. 2.6:	
Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffs Hoechst 33258	49
Abb. 2.7:	
Strukturformel des DNA-interkalierenden Farbstoffs SYBR® Green I	53
Abb. 2.8:	
Verifizierung der RTqPCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese	57

Ergebnisse:

Abb. 3.1:	
Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein/DNA-Verhältnis der proximalen Tubuluszellen (Wildtyp) nach Inkubation (24 h) mit steigenden ANP-Konzentrationen (Absolutwerte)	62

Abb. 3.2:	
Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein/DNA-Verhältnis der proximalen Tubuluszellen (Wildtyp) nach Inkubation (24 h) mit steigenden ANP-Konzentrationen (Relativwerte)	63
Abb. 3.3:	
Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein/DNA-Verhältnis der proximalen Tubuluszellen (Wildtyp) nach Inkubation (24 h) mit steigenden BNP-Konzentrationen (Absolutwerte)	65
Abb. 3.4:	
Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein/DNA-Verhältnis der proximalen Tubuluszellen (Wildtyp) nach Inkubation (24 h) mit steigenden BNP-Konzentrationen (Relativwerte)	66
Abb. 3.5:	
Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein/DNA-Verhältnis von PTC (Wt-Zellen) statisch bzw. nach Perfusion (24 h, 0,5 mm/s) (Absolutwerte)	69
Abb. 3.6:	
Protein/DNA-Verhältnis von PTC (Wt-Zellen) statisch bzw. nach Perfusion (24 h, 0,5 mm/s) (Relativwerte)	70
Abb. 3.7:	
Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein/DNA-Verhältnis von LLC-PK ₁ -Zellen statisch bzw. nach Perfusion (24 h, 1 mm/s) (Absolutwerte)	71
Abb. 3.8:	
Protein/DNA-Verhältnis von LLC-PK ₁ -Zellen statisch bzw. nach Perfusion (24 h, 1 mm/s) (Relativwerte)	72
Abb. 3.9:	
Renale Expression der Housekeeping-Gene RP L32 und β -Aktin in primären proximalen Tubuluszellen: perfundierte PTC (24 h, 0,5 mm/s) vs. Kontrollzellen	74
Abb. 3.10:	
Renale CDK2-, CDK4- und RP L32-Expression in primären proximalen Tubuluszellen: perfundierte PTC (24 h, 0,5 mm/s) vs. Kontrollzellen	76

Abb. 3.11:

Renale CDK2- bzw. CDK4-Expression in primären proximalen Tubuluszellen bezogen auf RP L32-Expression: perfundierte PTC (24 h, 0,5 mm/s) vs. Kontrollzellen 77

Abb. 3.12:

Renale NPR-C-, NPR-A- und RP L32-Expression in primären proximalen Tubuluszellen: perfundierte PTC (24 h, 0,5 mm/s) vs. Kontrollzellen 79

Abb. 3.13:

Renale NPR-C- bzw. NPR-A-Expression in primären proximalen Tubuluszellen bezogen auf RP L32-Expression (pro Gruppe n = 5): perfundierte PTC (24 h, 0,5 mm/s) vs. Kontrollzellen 80

Abb. 3.14:

Renale NEP- und RP L32-Expression in primären proximalen Tubuluszellen: perfundierte PTC (24 h, 0,5 mm/s) vs. Kontrollzellen 81

Abb. 3.15:

Renale NEP-Expression in primären proximalen Tubuluszellen bezogen auf RP L32-Expression: perfundierte PTC (24 h, 0,5 mm/s) vs. Kontrollzellen 82

Abb. 3.16:

Renale NHE3- und SGLT1-Expression in primären proximalen Tubuluszellen: perfundierte PTC (24 h, 0,5 mm/s) vs. Kontrollzellen 84

Abb. 3.17:

Renale NHE3- bzw. SGLT1-Expression in primären proximalen Tubuluszellen bezogen auf RP L32-Expression (pro Gruppe n = 4): perfundierte PTC (24 h, 0,5 mm/s) vs. Kontrollzellen 84

Abb. 3.18:

Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein/DNA-Verhältnis von unbehandelten proximalen Tubuluszellen: Wildtyp-Zellen vs. ANP-Knockout-Zellen (Absolutwerte) 87

Abb. 3.19:

Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein/DNA-Verhältnis von PTC statisch bzw. nach Perfusion (24 h, 0,5 mm/s): Wildtyp-Zellen vs. ANP-Knockout-Zellen (Absolutwerte) 89

Abb. 3.20:

Protein/DNA-Verhältnis von PTC statisch bzw. nach Perfusion (24 h, 0,5 mm/s): Wildtyp-Zellen vs. ANP-Knockout-Zellen (Relativwerte) 90

Abb. 3.21:

Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein/DNA-Verhältnis von PTC nach Inkubation (24 h) mit TGF β (100 pM): Wildtyp-Zellen vs. ANP-Knockout-Zellen (Absolutwerte) 92

Abb. 3.22:

Protein/DNA-Verhältnis von PTC nach Inkubation (24 h) mit TGF β (100 pM): Wildtyp-Zellen vs. ANP-Knockout-Zellen (Relativwerte) 93

Abb. 3.23:

Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein/DNA-Verhältnis von PTC nach Inkubation (24 h) mit ANP (100 nM): Wildtyp-Zellen vs. ANP-Knockout-Zellen (Absolutwerte) 95

Abb. 3.24:

Protein/DNA-Verhältnis von PTC nach Inkubation (24 h) mit ANP (100 nM): Wildtyp-Zellen vs. ANP-Knockout-Zellen (Relativwerte) 96

Abb. 3.25:

Renale BNP- und RP L32-Expression in primären proximalen Tubuluszellen: perfundierte PTC (24 h, 0,5 mm/s) vs. Kontrollzellen 99

Abb. 3.26:

Renale BNP-Expression in primären proximalen Tubuluszellen bezogen auf RP L32-Expression: perfundierte PTC (24 h, 0,5 mm/s) vs. Kontrollzellen 100

Materialien und Methoden:

Abb. 9.1:

Laufverhalten von DNA-Fragmenten in Agarose 169

VIII. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADH	Antidiuretisches Hormon (Adiuretin)
ANP	Atriales natriuretisches Peptid (atrial natriuretic peptide)
As	Aminosäure
AT ₁ -Rezeptor	Typ 1 Angiotensin II Rezeptor
AT ₂ -Rezeptor	Typ 2 Angiotensin II Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid (brain natriuretic peptide)
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2-Deoxyuridin
BSA	Bovine Serum Albumin, Rinderserumalbumin
C	Cytosin
° C	Grad Celsius
CDK	cyclin-dependent kinase (Cyclin-abhängige Kinase)
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CKI	cyclin-kinase-inhibitor (Cyclin-Kinase-Inhibitorproteine)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CNG	cyclic nucleotide-gated

CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
Cp	crossing point
d	Tag
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DNP	Dendroaspis natriuretisches Peptid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat (umfasst dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EIA	Enzym-Immunoassay
EIPA	5-ethylisopropyl amiloride
EM	Elektronenmikroskop
ER	endoplasmatisches Reticulum
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
g	Gramm; auch Verwendung im Sinne von Erdbeschleunigung (gravity)
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

GC	Guanylatcyclase
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GH	Growth Hormone
Glc	Glucose
GLUT2	glucose transporter 2
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ⁺	Proton
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HPRT	Hypoxanthinphosphoribosyltransferase
HWZ	Halbwertszeit
IGF1	Insulin-like Growth Factor 1
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
i.v.	intravenös
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K _F	Filtrationskoeffizient
KLD	kinase-like domain
KO	Knockout
l	Liter
mg	Milligramm
μ	Mikro

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar (µmol/l)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mM	Millimolar (mmol/l)
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule (physikalische Druckangabe)
min	Minute
Mio.	Million
M-MLV-RT	Moloney murine leukemia virus Reverse Transkriptase
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
mus	Mus musculus (Hausmaus)
n	Anzahl der Versuche
NBC-1	Na ⁺ -Bikarbonat-Kotransporter Typ 1
NCBI	National Center for Biotechnology Information (USA)
NEP 24.11	Neutrale Endopeptidase 24.11, Neprilysin
ng	Nanogramm
NHE ₃	Na ⁺ /H ⁺ -Exchanger, Typ 3
nm	Nanometer
nM	Nanomolar (nmol/l)

NP	Natriuretisches Peptid
NPR-A	Natriuretischer Peptidrezeptor A
NPR-B	Natriuretischer Peptidrezeptor B
NPR-C	Natriuretischer Peptidrezeptor C
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.a.	pro analysi
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	Proliferative cell nuclear antigen
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PDGF	Platelet-derived growth factor
p_{eff}	effektiver Filtrationsdruck
Pen/Strep	Penicillin und Streptomycin
pg	Pikogramm
PKG	Proteinkinase G
pM	Picomolar (pmol/l)
pmol	Picomol
pRB	Retinoblastoma-Protein
PTC	primäre proximale Tubuluszellen
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RBF	renaler Blutfluss
rcf	relative Zentrifugalkraft (relative centrifugal force)
RNA	Ribonukleinsäure
RP L32	ribosomales Protein L32

rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
RTqPCR	Real-time quantitative PCR, quantitative Echtzeit-PCR
s	Sekunde
SA-HRP	Streptavidin-horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SGLT1/2	Sodium/Glucose-Cotransporter 1/2 (sodium glucose linked transporter 1/2, sodium dependent glucose transporter 1/2)
sog.	sogenannt
T	Thymin
T3	Triiodothyronin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TGFβ	Transforming Growth Factor β
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UNx	Uninephrektomie
V	Volt
verd.	verdünnt
vs.	versus
Wt	Wildtyp
ZK	Zellkultur

IX. Materialien und Methoden

1. LLC-PK₁-Zelllinie sowie Mäuse für die Primärkultur

Als eukaryontische Zelllinie wurde für die in vitro-Experimente die der **LLC-PK₁**-Zellen (porcine kidney epithelial cells, American Type Culture Collection ATCC CRL-1392 [CL-101]) gewählt. Dabei handelt es sich um eine Nierenepithelzelllinie, die auf proximale Tubuluszellen des Schweins zurückgeht und dementsprechend auch typische Eigenschaften dieser Zellen zeigt. [21, 32] LLC-PK₁-Zellen wurden nämlich im Jahr 1958 aus renalem Kortexgewebe eines männlichen, juvenilen Schweins (New Hampshire Pig Kidney) isoliert und in Kultur gebracht. Im Rahmen dieser Arbeit fanden ausschließlich Zellen der Passagen 20-30 Anwendung, wobei LLC-PK₁-Zellen für bis zu 300 Passagen als stabil beschrieben wurden. [27]

Die hauptsächlich untersuchten **primären proximalen Tubuluszellen** wurden direkt aus Mäusenieren isoliert und kultiviert. Dabei wurden pro Versuchsansatz zwei Mäuse benötigt. Für Versuche mit Wildtyp-Zellen verwendete man je 2 Mäuse des Stammes C57BL/6 der Charles River GmbH, Sulzfeld (Deutschland). Darüberhinaus basierten die Versuche mit ANP-KO-Zellen auf je einer ANP-KO-Maus (ANP -/-) und einem Wt-Geschwistertier. ANP-KO-Mäuse waren von John et al. im Jahr 1995 generiert worden, indem das für das Pro-ANP kodierende Exon 2 deletiert wurde. [31] Bis zur Tötung der Mäuse für die Isolation der PTC war freier Zugang zu Standardfutter und Trinkwasser bei konstanter Raumtemperatur und 12-stündigen Hell-Dunkel-Intervallen gegeben.

2. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte und Gebrauchsgegenstände

Gerät - Typbezeichnung	Hersteller - Sitz der Firma
Autoklav 2540 EL	Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wettenberg
<u>Brutschränke:</u> Binder Inkubator C 150 Heraeus	WTB Binder, Labortechnik GmbH, Tuttlingen Heraeus Labor Center, Nürnberg

Elektrophoreseapparatur Elektrophoresis consort EV 231	Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen
<u>Kühl- und Gefrierschränke:</u> -80° C Tiefkühltruhe (QBF790V14) +4° C/-20° C Kühl-/Gefrierkombi	Schymke Klima-Kälte-Lüftung, Nürnberg
LightCycler® 480 Real-Time PCR System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Luminescence Spectrometer LS 50B	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau-Jügesheim
Magnetrührer MR 80 Magnetrührstäbchen	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH, Würzburg/Versbach (kurz: Hartenstein Laborbedarf)
<u>Mikroskope:</u> Fluovert FS (Umkehrmikroskop) Axioskop2 plus, Axioacam Fluoreszenz-/Phasenkontrastmikroskope	Leitz Messtechnik GmbH, Wetzlar Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Milliporeautomat Milli-Q®	Biocel, Merck Millipore, Billerica
NanoDrop Spectrophotometer ND1000	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Photokamera Revio KD-420Z	Konica Minolta Holdings, Inc.
<u>Pipetten:</u> Pipetman P1000, P100, P10 Multichannel Pipette	Gilson, Inc., Middleton (USA)
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
Plattenschüttler PMS-1000	Grant Bio, USA
Schlauchpumpe REGLO Analog	ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld
Sterilwerkbank s@femate 1.5 vision	Labotect GmbH, Göttingen
Sunrise Absorbance Reader	TECAN Austria Ges. m.b.H., Grödig/Salzburg
Thermocycler: Labcycler	SENSOQUEST Biomedical Electronics, Göttingen

Thermomixer	Clemens GmbH, Waldbüttelbrunn
Trockenschrank Heraeus	Heraeus Labor Center, Nürnberg
UV-Transilluminator	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Vakuumpumpe: KNF Absaugpumpe Typ AP86	Hartenstein Laborbedarf
<u>Vortexer:</u> MS1 Minishaker VTX-3000L Mixer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen UZUSIO, Tokio Japan
Waage R160P	Sartorius AG, Göttingen
<u>Wasserbad:</u> Julabo PC Haake FK	JULABO GmbH, Seelbach Labexchange - Die Laborgerätebörse GmbH, Burladingen
Zählkammer Neubauer improved + Deckglas	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
<u>Zentrifugen:</u> Centrifuge 5417 R CS-15R Centrifuge HERMLE Z300 neoLab®-Zentrifuge mit Vortexer Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge mit SS-34 Rotor	Eppendorf AG, Hamburg Beckman Coulter GmbH, Krefeld HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg DuPont de Nemours (Deutschland) GmbH, Neu-Isenburg

Alle anderen nicht im Einzelnen aufgeführten Geräte wurden über den Fachhandel erworben.

Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller - Sitz der Firma
CO ₂ -Gasflasche	Linde AG, Pullach
<u>Einmalhandschuhe:</u> Latex rotiprotect Nitril	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe VWR International GmbH, Darmstadt
Einmalkanülen steril 20G	Hartenstein Laborbedarf

Einmalspritzen steril (5 ml, 10 ml)	Hartenstein Laborbedarf
Falcon Kulturschalen (Durchmesser 35 mm)	BD Biosciences, Heidelberg/Becton Dickinson Franklin Lakes (USA)
<u>Glaswaren:</u> Schottgefäße, Glaspetrischalen, Erlenmeyerkolben, Bechergläser	Schott AG, Mainz
Kanülensammelbehälter (Inhalt 1,5 l)	Hartenstein Laborbedarf
Kryoröhrchen steril (Cryo Tube™ Vials, 1,8 ml) Kryobox, Stickstoffbehälter	NUNC A/S, Roskilde, Dänemark
<u>Mikrotiter-/Multiwellplatten:</u> Fluoreszenzplatte (für DNA-Bestimmung) Tissue Culture Plate (24-, 96-Well) Light Cycler 480 Multiwell Plate 96 + Abklebefolie	Eppendorf AG, Hamburg SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Nylon-Filtergewebe (Maschenweite 150 µm)	Hartenstein Laborbedarf
OP-Besteck (Pinzette, Schere)	MSG Medizinische Geräte, Handel und Service GmbH, Wuppertal
<u>Pipetten:</u> Auslaufpipetten steril (5ml, 10 ml, 25 ml) Pasteurpipetten (aus Glas)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht Brand GmbH + Co KG, Wertheim
Pipettenspitzen mit/ohne Filter (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf bzw. SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Reagenzröhrchen (15 ml, 50 ml)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
<u>Reagiergefäße:</u> Easy Cap (2 ml, 1,5 ml, 0,2 ml) Safe Seal (2 ml, 1,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg bzw. SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Schläuche autoklavierbar Innendurchmesser 0,89 mm, Länge 381 mm	ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld
Skalpellklingen steril	Hartenstein Laborbedarf
Sorvall-Zentrifugenröhrchen 50 ml (525-0040)	VWR International GmbH, Darmstadt
Standard-Schlauchverbinder aus Kunststoff (gerade)	ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld

<u>Sterilfilter:</u>	
Filtropur BT50 Flaschenaufsatzfilter (Porengröße 0,2 µm)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Filtropur S 0.2 Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,2 µm)	
50 ml-Spritze mit Luer-Lock (Typ infuject)	Hartenstein Laborbedarf
Sterilisationsklebeband	Hartenstein Laborbedarf
Zellkulturflasche 75 cm ²	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht

Alle übrigen nicht explizit aufgelisteten Verbrauchsmaterialien wurden über den Laborbedarfsfachhandel eingekauft und besaßen die erforderliche Qualität.

3. Zellkulturmedien, Medienzusätze sowie weitere Puffer und Lösungen

Zellkulturmedien und Medienzusätze

Medium bzw. Supplement	Hersteller - Sitz der Firma
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) (P04-04510) 500 ml: mit 4,5 g/l Glucose, stab. L-Glutamin, Natrium-Pyruvat, 3,7 g/l NaHCO ₃	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
DMEM/F12 1:1 Mixture (P04-41250) 500 ml: mit L-Glutamin, 15 mM Hepes, 1,2 g/l NaHCO ₃	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Epidermal Growth Factor EGF (E9644) 0,2 mg	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
FCS (fetal calf serum) (3302)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Hydrocortison (H-4001) 5 g	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Insulin-Transferrin-Selenium-G Supplement (100x) (41400) 10 ml	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin) (15140)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
3,3',5-Triiodo-L-thyronine sodium salt (T3) (T5516) 1 mg	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Im Folgenden ist die Zusammensetzung der Medien sowohl für die LLC-PK₁-Zellen als auch für die PTC in Abhängigkeit ihrer Verwendung im Überblick dargestellt. Die gebrauchsfertigen Medien wurden ebenso wie das Fetale Kälberserum in 50 ml Aliquots, die Antibiotika-Lösung in 15 ml Aliquots aufbewahrt.

LLC-PK₁-Zellen:

- **Kulturmedium** (75cm² ZK-Flasche): DMEM + 10 % FCS + 1 % Pen/Strep
- **Aussaatmedium** (24 Well-Platte): DMEM + 0,5 % FCS + 1 % Pen/Strep
- **Versuchsmedium** (Superfusion): DMEM + 1 % Pen/Strep
- **Einfriermedium**: Kulturmedium + 8 % DMSO

PTC:

- **Isoliermedium**: DMEM/F12
- **Kulturmedium** (Kulturschale 35 mm Durchmesser)/**Aussaatmedium** (24 Well-Platte):
 DMEM/F12 (500 ml)
 1 % FCS (5 ml)
 1 % Pen/Strep (5 ml)
 1x ITS (5 ml von 100x ITS)
 50 nM Hydrocortison (180 µl von 50 µg/ml Stammlösung)
 5 nM T3 (83 µl von 30 µM Stammlösung)
 5 nM EGF (25 µl von 100 µM Stammlösung)
- **Versuchsmedium** (Stimulation, Superfusion): DMEM/F12 + 1 % Pen/Strep

Stammlösungen für das PTC-Kulturmedium (Hormonzusätze):

Hydrocortison [50 µg/ml]: 500 µg abwiegen, in 10 ml EtOH lösen, bei -20° C lagern
 T3 [30 µM]: 1 mg in 1 ml 1M NaOH lösen, mit 49 ml DMEM/F12 auffüllen, aliquotieren, bei -20° C lagern
 EGF [100 µM]: 0,2 mg in 330 µl 10mM Essigsäure + 0,1 % BSA (sterilfiltriert) lösen, aliquotieren, bei -20° C lagern

Stammlösungen für die Stimulationsansätze:

ANP [100 µM]: 0,1 mg in 327 µl sterilfiltriertem Wasser lösen
 BNP [100 µM]: 0,1 mg in 203 µl sterilfiltriertem Wasser lösen
 TGF-β1 [100 nM]: 2 µg in 800 µl 4 mM HCl + 1 mg/ml BSA (sterilfiltriert) lösen
 Anschließend wurden alle hergestellten Stammlösungen aliquotiert und bei -20° C gelagert.

Puffer und Lösungen

Anwendung	Puffer/Lösung	Zusammensetzung
<u>Agarosegelelektrophorese</u>	Ethidiumbromid-Lösung	100 ml 1x TBE-Puffer 20 µl Ethidiumbromid
	10x TBE	108 g Tris 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M Na ₂ EDTA (pH 8,0) mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen
	1x TBE	100 ml 10x TBE-Puffer 900 ml H ₂ O
<u>DNA-Bestimmung</u>	TE-Puffer	10 mM Tris-Base 1 mM EDTA mit HCl pH auf 7,4 einstellen
<u>Isolation von PTC</u>	HBSS (pH 7,4)	5,4 mM KCl 0,3 mM Na ₂ HPO ₄ 0,4 mM KH ₂ PO ₄ 4,2 mM NaHCO ₃ 1,3 mM CaCl ₂ 0,5 mM MgCl ₂ 0,6 mM MgSO ₄ 137 mM NaCl 5,6 mM D-Glucose mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen, sterilfiltrieren
	1x PBS (pH 7,4)	siehe unter Zellkultur
	2x PBS + Glucose (pH 7,4)	16,13 g NaCl (276 mM) 0,4 g KCl (5,42 mM) 3,6 g Na ₂ HPO ₄ (20,3 mM) 0,48 g KH ₂ PO ₄ (3,54 mM) 5 ml 1 M D-Glucose-Lösung (5 mM) mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen, sterilfiltrieren

	Percoll-Lösung	45 % Percoll (22,5 ml) 55 % 2x PBS + Glucose (27,5 ml)
	Verdauungslösung	5 ml HBSS 5 ml DMEM/F12 einwiegen: 25 mg BSA 10 mg Collagenase Type 2 lösen bei 37° C, sterilfiltrieren
<u>RNA</u>	DEPC-H ₂ O	0,1 % (v/v) DEPC in dd H ₂ O, kräftig schütteln, über Nacht stehen lassen, am folgenden Tag autoklavieren
	Ethanol 75 %	37,5 ml 99 % EtOH p.a. 12,5 ml DEPC-H ₂ O
<u>Zellkultur</u>	Ethanol 70 %	700 ml 99 % EtOH (technisch) 290 ml H ₂ O
	10x PBS (pH 7,4)	80,6 g NaCl (1380 mM) 2,0 g KCl (27,1 mM) 18,1 g Na ₂ HPO ₄ (101,5 mM) 2,4 g KH ₂ PO ₄ (17,7 mM) mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen, sterilfiltrieren
	1x PBS (pH 7,4)	100 ml 10x PBS 900 ml H ₂ O
	Wasser	sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße)

Zum Einstellen des pH-Werts der Lösungen auf 7,4 diene soweit nicht anders angegeben bei Bedarf 37%ige Salzsäure HCl bzw. konzentrierte Natronlauge NaOH.

4. Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller - Sitz der Firma
ANP rat (A8208) 0,1 mg	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

BNP-45 (Mouse) (011-23) 0,1 mg	Phoenix Pharmaceuticals, Inc., California (USA), Phoenix Europe GmbH, Karlsruhe
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
BSA	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Calciumchlorid CaCl_2	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform	Acros Organics, Morris Plains (USA)
DEPC	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
D-(+)-Glucose	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4	Merck KGaA, Darmstadt
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt
6x DNA Loading Dye	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
dNTP Set [2,5 mM]	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt
Essigsäure (100 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol (99 %) p.a.	Acros Organics, Morris Plains (USA)
Ethidiumbromid	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
5x First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder [0,5 µg/µl]	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Isopropanol	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Kaliumchlorid KCl	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid MgCl_2	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat MgSO_4	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid NaCl	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat NaHCO_3	Merck KGaA, Darmstadt
Natronlauge NaOH	Merck KGaA, Darmstadt
Oligo(dT) ₁₅ Primer [0,5 µg/µl]	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
Percoll	GE Healthcare Europe GmbH, München
Salzsäure HCl	Merck KGaA, Darmstadt

SB 431542 hydrate (S4317) 5 mg	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
TGF- β 1, recombinant human (240-B)	R&D Systems GmbH, Minneapolis (USA)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, USB Products	Affymetrix Inc., Cleveland (USA)
Trypsin/EDTA-Solution 0,05 %/0,02 % in PBS, ohne Ca^{2+} / Mg^{2+} , pH 7,6 (P10-023500)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Universal Agarose 500 g	Bio&SELL e.K., Feucht

Alle anderen nicht gesondert erwähnten Chemikalien wurden über den Chemikalienhandel erworben. Sie besaßen den höchsten erhältlichen Reinheitsgrad, wenigstens jedoch Analysegrad.

5. Enzyme und Kit-Systeme

Produktbezeichnung	Hersteller - Sitz der Firma	Anwendung
Collagenase Type 2 [240 U/mg]	Worthington Biochemical Corp., Lakewood (USA)	Isolation von PTC
EIA Kits: EK-005-24 ANP (Rat, Mouse) EK-011-23 BNP-45/ BNP (51-95) (Mouse)	Phoenix Pharmaceuticals, Inc., California (USA)/Phoenix Europe GmbH, Karlsruhe	Konzentrationsbestimmung im Perfusat
Fluo Reporter® Blue Fluorometric dsDNA Quantitation Kit (F-2962): Hoechst 33258 in DMSO/H ₂ O 1:4 (v/v) TNE-Puffer	Molecular Probes/ Invitrogen, Karlsruhe	DNA-Bestimmung
Light Cycler 480 SYBR® Green I Master	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	RTqPCR
M-MLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase) 40.000 U [200 U/ μ l]	Invitrogen, Karlsruhe	Reverse Transkription

Protein Quantification Assay: Protein Solving Buffer PSB Ouantification Reagent QR BSA 1 mg (Standard)	Macherey-Nagel, Düren	Protein-Bestimmung
TRIsure™	Bioline, Luckenwalde	RNA-Isolation

6. Oligonukleotide (Primer)

Die im Rahmen der RTqPCR verwendeten synthetischen Oligonukleotide wurden mittels NCBI Primer-BLAST entworfen und von der biomers.net GmbH (Ulm) bezogen. Zunächst wurden die Primer in der im Herstellerprotokoll angegebenen Menge Wasser gelöst, sodass eine Stammlösung mit der Konzentration 100 pmol/μl vorlag. Für den Einsatz in der RTqPCR verdünnte man sowohl den forward Primer als auch den reverse Primer im Verhältnis 1:10 (10 pmol/μl). In der folgenden Tabelle sind die Primersequenzen (jeweils in 5' - 3'-Richtung), die spezifischen Annealing-Temperaturen sowie die Länge des zu erwartenden PCR-Produkts angegeben.

Primer-bezeichnung	Primersequenz (5' - 3')	Annealing-Temperatur (° C)	Produktlänge (bp)
ANP	forward GGCTGCAACAGCTTCCGGTACCG reverse GAGGGTGTTCAACCACGCCACAG	60	146
AT _{1A} -Rezeptor mus	forward TCACCAGATCAAGTGCATTTTGA reverse AGAGTTAAGGGCCATTTTGCTTT	60	74
β-Aktin mus	forward CCGCCCTAGGCACCAGGGTG reverse GGCTGGGGTGTTGAAGGTCTCAAA	60	286
BNP	forward CTGAAGGTGCTGTCCCAGAT	60	199

	reverse GTTCTTTTGTGAGGCCTTGG		
CDK 2	forward GACCGCAGTGTCTGCCCCAC reverse GCCAGGGCTGCTTTGGCTGA	60	282
CDK 4	forward GTCTGGCCCGAAGCGTCCAG reverse CTGTGCTGACGGGAAGGCCC	62	290
NEP 24.11	forward CGGCCAGAGTATGCAGTCAA reverse TTTGGCAAATCTTGCCGTGG	60	200
NHE ₃ mus	forward CTACATGGCCGGGCTTTC reverse TAATTGTGTCCAATTTGTCCTGAGAT	60	71
NPR-A	forward CTCAACATCACAGTAAATCACC reverse GGCTTTGCCCAAACACATCC	60	267
NPR-C	forward GGCTCAATGAGGAGGATTACGTG reverse CACAGAGAAGTCCCCATACCG	60	214
RP L32	forward TTAAGCGAACTGGCGGAAAC reverse TTGTTGCTCCCATAACCGATG	60	100
SGLT1 mus	forward CGGAAGAAGGCATCTGAGAA reverse AATCAGCACGAGGATGAACA	60	63

7. Software und Internetadressen

- Microsoft Office 2007:
 - Microsoft Office Excel 2007
 - Microsoft Office PowerPoint 2007
 - Microsoft Office Word 2007
- Microsoft Office Picture Manager
- GraphPad Prism 5
- Primerdesign: NCBI Primer-BLAST
- LightCycler® 480 Software Version LCS480 1.5.0.39
- AxioVision Software von Zeiss, Release 4.8.2 (06-2010)
- The National Center for Biotechnology Information (NCBI):
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

8. Standardmethoden

8.1 Prinzip der Standard-PCR

Da die unter 5.3 (Abschnitt II.) abgehandelte Quantifizierung von Nukleinsäuren auf dem Prinzip der PCR basiert, soll an dieser Stelle ergänzend der zugrunde liegende Mechanismus dargelegt werden. Die Polymerasekettenreaktion läuft im Allgemeinen in drei Schritten ab, wobei 20-40 Zyklen durchlaufen werden. Das Erhitzen der Template-DNA jeweils zu Beginn eines Zyklus auf 95° C führt zur **Denaturierung** des DNA-Doppelstrangs. Nach Absenken der Temperatur auf ca. 60° C, abhängig von der Länge und Basenzusammensetzung der Primer, kommt es zur Hybridisierung der im Überschuss vorhandenen Oligonukleotide an die Einzelstränge der Matrizen-DNA (**Annealing**). Im dritten Schritt erfolgt die Synthese der Komplementärstränge bei 72° C, dem Temperaturoptimum der thermostabilen DNA-Polymerase (**Elongation**). Da die Kettenverlängerung an beiden Strängen der Template-DNA abläuft, verdoppelt sich unter optimalen Bedingungen die Menge des definierten DNA-Abschnitts pro Zyklus. Bei n Zyklen entstehen so theoretisch 2ⁿ Kopien der zu amplifizierenden DNA-Sequenz. Diese zunächst exponentielle Amplifikation bildet die Grundlage bei der RTqPCR.

8.2 Herstellung des Agarosegels

Entscheidend für die Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe ist bei der Gelelektrophorese die Zusammensetzung der Gelmatrix, das heißt die verwendete Agarosekonzentration (w/v). Je kleiner die zu trennenden Moleküle sind, umso höher muss die Agarosekonzentration des Gels gewählt werden. Zudem wandern größere DNA-Fragmente aufgrund der Siebstruktur der Agarose langsamer und damit in der vorgegebenen Zeit weniger weit als kleinere. Abb. 9.1 veranschaulicht diesen Zusammenhang: Die Laufstrecke verhält sich innerhalb eines bestimmten Bereichs umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentlänge.

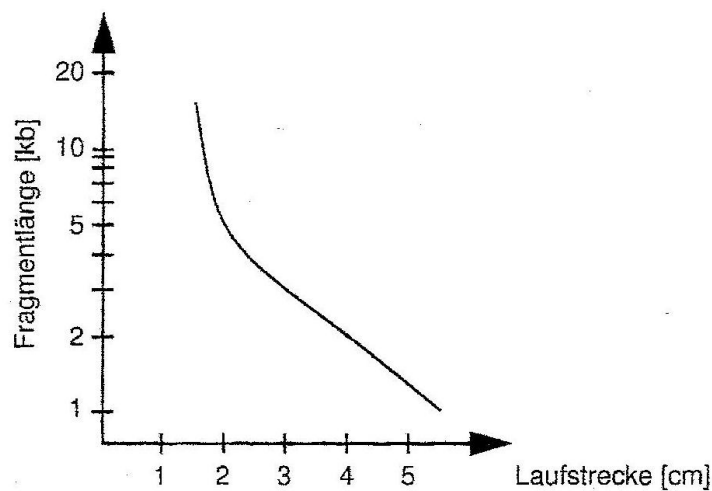


Abb. 9.1: Laufverhalten von DNA-Fragmenten in Agarose (aus [38])

Für die im Methodenteil unter 5.4 beschriebene Anwendung wurde unter Berücksichtigung der erwarteten PCR-Produktlängen zwischen 100 und 300 bp ein 2%iges TBE-Agarosegel hergestellt. Hierzu wurde 1,2 g Agarose in 60 ml 1x TBE-Elektrophoresepuffer mit Hilfe eines Mikrowellenofens aufgeköcht bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Eine Schlierenbildung war durch Schwenken des Gefäßes zu vermeiden. Anschließend musste diese visköse Lösung möglichst ohne Luftblasenbildung in eine vorbereitete Kammer gegossen und zwei Kämme als Spacer für die Geltaschen eingelegt werden. Das polymerisierte Gel konnte dann gegebenenfalls in Folie gewickelt bei 4° C vorübergehend gelagert werden.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die mich während des gesamten „Projekts Doktorarbeit“ sowohl bei der Labortätigkeit als auch beim Verfassen der Arbeit unterstützt und somit zum Entstehen und Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben:

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn **Prof. Dr. Frank Schweda** für die Vergabe dieses äußerst spannenden und medizinisch sehr relevanten Themas und sein damit in mich gesetztes Vertrauen. Sein großes Interesse an meiner Arbeit, die intensive Betreuung sowie seine ständige Diskussionsbereitschaft waren für mich dabei von zentraler Bedeutung. Prof. Schweda schaffte es durch seine Begeisterung für die Forschung, seine offene Art und sein unglaubliches Wissen immer wieder aufs Neue mein Interesse an der Thematik sowie meinen Ehrgeiz und Eifer am experimentellen Arbeiten zu wecken. Insgesamt konnte ich fachlich wie auch persönlich sehr von dieser Zusammenarbeit profitieren.

Außerdem möchte ich mich bei Frau **Dr. Andrea Schreiber** dafür bedanken, dass sie mich mit viel Geduld und Engagement im Labor eingearbeitet und zum experimentellen Arbeiten angeleitet hat. Ganz besonders danke ich ihr dafür, dass ich von ihr die „Kunst der Zellkultur“ erlernen durfte. Dabei stand sie mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat sowohl in theoretischen als auch in praktischen Fragen zur Seite. Ihre Hilfsbereitschaft und wertvollen Hinweise in Sachen Zellkultur weiß ich sehr zu schätzen.

Auch Dr. Fadi al Dehni möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken.

Bei den Mitarbeitern des Labors, namentlich bei Katharina Ehm, Regine Volkmann, Frieda Webinger und Robert Götz, bedanke ich mich herzlich für ihre Hilfsbereitschaft und Geduld. Sie standen mir stets als Ansprechpartner bei auftretenden technischen Problemen zur Seite. Ganz besonderer Dank gilt Frau Katharina Ehm für ihre Unterstützung und Kreativität beim Fotografieren des Percollgradienten. Ihr offenes Ohr für meine technischen Fragen besonders zur PCR und RNA-Isolation weiß ich sehr zu schätzen. Insgesamt hat mir die Zusammenarbeit mit ihr sehr viel Freude bereitet. Frau Regine Volkmann danke ich besonders für ihre Bemühungen, mir die Methode des Western Immunoblotting näher zu bringen sowie ihr Engagement beim Fotografieren der proximalen Tubuli. Dabei konnte ich

von ihrer Erfahrung mit dem Fluoreszenzmikroskop sehr profitieren. Frau Frieda Webinger war mir in Fragen zur Tierhaltung eine große Stütze.

Herrn Prof. Dr. Kunzelmann und seiner Arbeitsgruppe möchte ich für die Mitbenutzung der Räumlichkeiten sowie verschiedener Geräte danken. Außerdem danke ich Frau Dr. Jiraporn Ousingsawat für ihre Hilfsbereitschaft bei der Aufnahme der Fotos der proximalen Tubuli.

Nicht zuletzt gilt meine uneingeschränkte Dankbarkeit meiner Familie und meinen Freunden. Meinen Eltern danke ich, dass sie von Anfang an mein Vorhaben unterstützt und zu jeder Zeit hinter mir gestanden haben. Ihre Hilfe in allen Bereichen war für mich von größter Bedeutung. Besonders weiß ich auch die offenen Gespräche mit sehr guten Freunden zu schätzen, die mich verstanden und es geschafft haben mich immer wieder neu für die Arbeit zu motivieren.

Auch allen weiteren Menschen, die mich sowohl fachlich als auch persönlich unterstützt haben, die ich aber nicht alle namentlich aufführen kann, gilt mein Dank!

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Verena Lehnerer, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....

Verena Lehnerer

Maxhütte-Haidhof, den 07. Sept. 2015